Fukuoka, Japan. Kyushu Univ. Dept of Fish.
the Fish. Res. Lab.
Contributions

Contributions from the Department of Fisheries

and

the Fishery Research Laboratory, Kyushu University

No. 5 (1959)

LIBRARY

JAN 9 1961

FISH & WILDLIFE SERVICE

Foreword

After the Department of Fisheries and the attached Fishery Research Laboratory of Kyushu University were founded in 1941 and 1944, respectively, the research activities were greatly inhibited due to the outbreak of World War II and the restoration from its damage. After the War, activities were resumed and an increasing number of scientific papers have been published in various journals and bulletins.

It is, of course, difficult to obtain all of the available reports on the science of fisheries, particularly those which are carried out in Japan. This is perhaps one of the reasons why there are frequent duplication in and neglect of related works in this field.

It is hoped that this bulletin which is a compilation of all the scientific achievements from our institute will render our research works available to fisheries research organizations in foreign countries. The exchange of your scientific publications with this bulletin will be acknowledged with appreciation and will serve to promote the advancement of the science of fisheries in the whole world.

September, 1959

Department of Fisheries and
Fishery Research Laboratory,
Kyushu University,
Fukuoka, Japan

List of periodicals wherein published

Botanical Magazine, Tokyo	(植 物 学 雑 誌)
Breviora	
Bulletin of the Biogeographical Society of Japan	(日本生物地理学会々報)
Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries	(日 本 水 産 学 会 誌)
Collecting and Breeding	(採 集 と 飼 育)
Japanese Journal of Ecology	(日 本 生 態 学 会 誌)
Japanese Journal of Ichthyology	(魚 類 学 雑 誌)
Japanese Journal of Limnology	(陸 水 学 雑 誌)
Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan	(日 本 農 芸 化 学 会 誌)
Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University	(九 大 農 学 部 紀 要)
Journal of Japanese Botany	(植 物 研 究 雑 誌)
Journal of the Oceanographical Society of Japan	
Kagaku	(科 学)
Nutrition and Food	
Proceedings of the Japan Academy	(日 本 学 士 院 紀 事)
Proceedings of the 7th Pacific Science Congress	
Publications of the Seto Marine Biological Laboratory	
Records of Oceanographic Works in Japan	
Research in the effects and influences of the Nuclear Bomb Test Explosions (Tokyo)	
Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University	(九大農学部学芸雑誌)
Seibutsu	(生 物)
Sōrui	(藻 類)

Contributions from the Department of Fisheries and the Fishery Research Laboratory, Kyushu University. No. 5 (1959)

—— Biological Section ——

FUJITA, S., UCHIDA, K.	Spawning habits and early development of a sargassum fish, *Pterophryne histrio* (LINNÉ) ハナオコゼの産卵習性と初期発生	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **17** (3) : 277～282 (1959)
FUJITA, S., UCHIDA, K.	Breeding habits and rearing of larvae of a blennioid fish, *Ernogrammus hexagrammus* (TEMMINCK et SCHLEGEL) ムスジガジの産卵習性と幼生飼育	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **17** (3) : 283～289 (1959)
SEGAWA, S., SAWADA, T., HIGAKI, M., YOSHIDA, T.	Studies on the floating seaweeds – I. Annual vicissitude of floating seaweeds in the Tsuyazaki region 流れ藻の海藻学的研究 – Ⅰ. 津屋崎近海流れ藻の周年変化	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **17** (1) : 83～89 (1959)
SEGAWA, S., SAWADA, T., HIGAKI, M., YOSHIDA, T.	Studies on the floating seaweeds – II. Floating seaweeds found in Iki-Tusima region 流れ藻の海藻学的研究 – Ⅱ. 対馬・北九州海域にみられる流れ藻	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **17** (3) : 291～297 (1959)
SEGAWA, S., SAWADA, T., HIGAKI, M., YOSHIDA, T.	Studies on the floating seaweeds – III. Some considerations on the formation of the floating seaweeds 流れ藻の海藻学的研究 – Ⅲ. 流れ藻形成機構に関する考察	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **17** (3) : 299～305 (1959)
TAKESHITA, K., AIKAWA, H.	Biology of the Japanese anchovy, *Engraulis japonica* (HOUTTUYN), in the Nankai region. I.	Records Oceanogr. Works Japan, No. 3 : 201～216 (1959)
TSUKAHARA, H.	Studies on the flying-fishes of the Amakusa Islands Part I. Faunal discussion with the life-historical notes	J. Fac. Agr. Kyshu Univ., **11** (2) : 165～189 (1959)
YOSHIDA, T.	Life-cycle of a species of *Batrachospermum* found in northern Kyushu, Japan	Japan. J. Botany **17** (1) : 29～42 (1959)

TOMIYAMA, T., YONE, Y., KOBAYASHI, K.	The penetration of chlortetracycline into tissues of sockeye salmon on CTC-dip treatment and its destruction on heating ベニザケのクロルテトラサイクリン処理による各組織への滲透量および加熱によるその破壊度	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **24** (12) : 1012～1018 (1959)
YONE, Y., TOMIYAMA, T., HAMADA, S.	Comparative effectiveness of various chlortetracycline (CTC)-treatments in keeping quality of trawled fish and CTC residue on treated fish 種々のクロルテトラサイクリン (CTC) 処理方法による底引漁獲物の鮮度保持効果および各処理魚体内の CTC 分布	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **25** (2) : 156～162 (1959)
TOMIYAMA, T., YONE, Y.	Effectiveness of dip in iced chlortetracycline (CTC) - containing sea water on keeping quality of mackerel aboard ship and determination of CTC residue on the fish 船上におけるサバの鮮度保持に対するクロルテトラサイクリン (CTC) 水氷浸漬の効果および CTC の残存量	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **25** (4) : 290～293 (1959)
TOMIYAMA, T., YONE, Y.	Effectiveness of tetracyclines treatment on quality improvement of processed foods –II. Quality improvement and chlortetracycline residue of salt salmon due to CTC-treatment テトラサイクリン類による処理が加工食品の品質に及ぼす効果 –Ⅱ. CTC を併用したサケ塩蔵品中の CTC の残存量および製品の品質向上	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries **25** (1) : 67～71(1959)
TOMIYAMA, T., YONE, Y., KITAHARA, K.	A chemical method for determination of chlortetracycline – I. A new fluorometric method クロルテトラサイクリンの化学的定量法 –Ⅰ. 一新螢光定量法	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **25** (3) : 234～239 (1959)
TOMIYAMA, T., KOBAYASHI, K., YONE, Y.	A practical cylinder plate assay method for determination of chlortetracycline in tissues 組織中のクロルテトラサイクリンの簡易 cylinder plate 法	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **24** (11) : 937～942 (1959)

TOMIYAMA, T., ŌYAMA, S.	A practical assay method for determination of tetracycline and oxytetracycline in tissues 組織中のテトラサイクリンおよびオキシテトラサイクリンの簡易定量法	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **25** (3) : 228～233 (1959)
TSUDA, A., MORI, K., TOMIYAMA, T.	Studies on the method for testing the spoilage of Food－X. Errors involved in Ota's method for determination of histamine 食品の鮮度測定法に関する研究－X．太田氏のヒスタミン定量法の誤差について	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **25** (5) : 361～367 (1959)
TSUDA, A., TOMIYAMA, T.	Studies on the method for testing the spoilage of food－ XI. A new method for determintion of Histamine in tissues 食品中の鮮度測定法に関する研究－XI．組織中のヒスタミンの一新定量法	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **25** (6) : 451～456 (1959)
TOYOMIZU, M., ENOMOTO, N., TOMIYASU, Y.	Preparation of quaternary ammonium salts from fish oil and their antibiotic action 魚油から quaternary ammonium 塩の製造並びにその抗菌作用について	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **24**(9) : 743～748 (1959)
KITAMIKADO, M.	Alteration of yeast cell protein by denaturing agents	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **11** (2) : 155～164 (1959)
KOBAYASHI, K., TOMIYAMA, T.	Studies on absorption and metabolism of P^{32} in aquatic organism－I. Turnover of P^{32} in *Rhizodrilus limasus* (HATAI) 水棲生物における P^{32} の吸収および代謝に関する研究－I．マミズイトミミズによる P^{32} の吸収および代謝	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **25** (7–9) : 576～580 (1959)

ハナオコゼの産卵習性と初期発生

藤田 矢郎・内田恵太郎

Spawning habits and early development of a sargassum fish, *Pterophryne histrio* (Linné)

Shiro Fujita and Keitaro Uchida

九州大學農學部學藝雜誌, 第17巻 第3号, 別刷, 昭和34年12月20日

Reprinted from the Science Bulletion of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 17, no. 3, December 20, 1959

ハナオコゼの産卵習性と初期発生

藤田矢郎・内田恵太郎

Spawning habits and early development of a sargassum fish, *Pterophryne histrio* (Linné)

Shiro Fujita and Keitaro Uchida

ハナオコゼ *Pterophryne histrio* (Linné) はイザリウオ科 Antennariidae の魚で広く世界の温熱帯の海に分布し，流れ藻に乗つて海面を漂う．ハナオコゼ類の産卵習性については中村秀也が 1933 年小湊臨海実験所でクロハナオコゼ *Pterophryne ranina* (Tilesius) 雌とハナオコゼ雄の間で行われた産卵行動を報告した．その後 Gudger は 1937 年流れ藻に産みつけられた卵塊がハナオコゼ類の卵ではなくて，トビウオ類の卵であることを明らかにしたが，ハナオコゼの産卵行動及び初期発生については明らかにしていない．1954 年 Mosher は北米 Florida 州にある Lerner Marine Laboratory でハナオコゼ *Histrio histrio* (Linné) の親魚を飼育して産卵に至らしめ，卵の構造，産卵週期，産卵行動，卵内発生，孵化仔魚について詳細に報告しているが，産卵に於ける雄の行動については，同報文中 Mosher と一緒に産卵行動を観察して資料を提供した Rasquin の観察が一部異なつていることを明らかにしている．筆者は 1955 年夏本邦産ハナオコゼの産卵行動と初期発生を観察して Mosher の報告とほぼ同様の結果を得たが，一，二の点について異なる観察もあつたのでここに報告する．

本研究は主として藤田が行つたもので，内田はその全般的指導に当つた．

材料及び飼育

1955 年 7 月 15 日，門司市瀬戸内海側沿岸のマスアミに入つたハナオコゼ 7 尾（全長 90～151 mm）を底に黒い玉砂利を敷いた容量 1 トン（1 m× 1 m× 1 m）の流水式水槽に収容し，1 日 1 回生きたメジナやマダイの稚魚を投与した．空腹になつたハナオコゼは胸鰭で水底を匍匐しながら数尾で小魚を丸く囲んでじりじりつめより最後にぱつと飛びかかつてのむ．飼育当初は生餌しか食べなかつたが，後では新鮮な魚肉で飼育出来た．

産卵期及び卵

産卵期．1955 年 7 月 20 日から 9 月 8 日までの間に水槽中で 8 回産卵が行われたが，9 月中旬以降は全く産卵は見られなかつた．この間の飼育水温は 25～29°C であつた．1956 年 8 月 22 日から 9 月 10 日までの間に同一親魚（全長 182 mm）によつて 3 回産卵が行われたが其後は産卵は見られなかつた．この間の水温は 24～27°C であつた．1955 年

と 1956 年の結果から水温が低下すると産卵は行われないものと考えられる.[1]

卵.[2] ハナオコゼの卵は無色透明の光沢のある寒天状物質に包まれた帯状の凝集浮游卵で新しく産み出された卵帯は両端から内側に巻いて卵塊を形成している. 産み出された直後その卵塊を引き延した卵帯長は 380～760 mm, 幅 60～100 mm であつた(7 卵塊測定). 卵を包んでいる寒天状物質の表面には無数の細かい長六角形(長さ 0.03 mm×幅 0.01 mm)の亀甲状の模様があり, 寒天状物質の内部は不正形の六角形又は五角形の小房(長さ 0.7～1.0 mm, 幅 0.6～0.9 mm)に区劃され, その中に 1 個ずつ卵粒が入つて居り, 小房内では卵粒は自由に廻転する. 卵は無色透明の楕円形で長径 0.62～0.65 mm, 短径 0.53～0.57 mm で油球はなく, 寒天状物質中に 3 層又は 2 層にはめ込まれている. 卵粒が入つている小房は卵発生が進むにつれて膨脹し区劃が乱れ, 寒天状物質の凝集力も次第に弱まつて, 水槽中の飼育状態では卵の一部は筋肉節数 6 から 11 の時期に寒天状の基質から脱落して自由分離浮游卵になる. 卵帯長 450 mm, 幅 68 mm の卵塊の総卵数は 89,635 個であつた.

産卵行動

7 月 20 日から 9 月 8 日の間に 8 回産卵が行われたが, その中 5 回産卵行動を観察した.

産卵の半日乃至 1 日位前になると雌の腹部が急に膨出する. 最初の求愛行動は産卵の行われる日の午前中に始まり, 徐々に間歇的に激しくなる. 各回とも産卵は夕方 16 時から 20 時の間に行われた. 腹部の膨出した雌は他のハナオコゼを避けて水槽の片隅や岩蔭に静止している. 雄は時々この静止している雌の腹部を頭又は口でつつき押し上げ, 水槽の中央に追い出す様にする. 雌は水底をよたよた泳ぎながら岩蔭に移動する. 産卵が近づき求愛行動が激しくなると数尾の雄が頭で雌の腹部を押しながら胴上げするかの様にして水中を雌の体を運ぶ. この動作をしばらく続けている中に雄は雌から離れ, 口で雄同志相手の尾柄部をねらつてぐるぐる廻つているが, 再び岩蔭に逃れた雌の所に引返して追尾を始める. これを 1～2 時間繰返している中に雌は数尾の雄に追尾されながら急に水面に向つて突進しながら放卵する. 雌に接触を保ちながら追尾していた雄の中の 1 尾は産み出された卵塊の中に突入するかの様にして卵塊を頭部に掛けてこれを引きながら表層より下層に向つて狂つた様に泳ぐ. 下層から再び表層に向つて泳ぐこともある. 卵塊が雄の体より離れると水面に浮ぶ. 卵が雄の体から離れた直後卵塊を運んでいた雄を捕えて検査すると卵塊の端切れを口に喰えている場合も見られた.

1) Mosher (1954) は Lerner Marine Laboratory に於ける 1 月上旬より 3 月始めに至る観察と既存の文献からハナオコゼの産卵期を特定の時期に限定することは出来ないと報告している.

2) 中村 (1933) によれば, クロハナオコゼの卵は極くうすい紅色の凝集浮游卵で卵帯長 200 mm, 幅 100 mm である. Smith の Woods Hole に於ける観察によれば Sargasso fish (種名記載なし) の卵帯長は 450～920 mm, 幅 75 mm, 厚さ 6 mm である (Gudger 1937). Mosher (1954) によればハナオコゼの卵塊は透明で光沢があり, 卵帯は両端から巻いて卵塊を形成し, 卵塊のまま長さ 3½ インチ, 卵は数層に重なり, 各卵はよく区劃された膜によつて他の卵から分離されており, 卵径は長径 0.7 mm, 短径 0.6 mm である. 孵化前 4 日の時期に卵の入つている区劃の枠がゆるくなり, 不完全な網目を残して卵帯は軟くなり, 最初の大きさの約 3 倍になる. 区劃の崩壊は 1 例に於ては胚体形成前に見られた.

卵内発生

卵内発生の諸経過は各回ともほぼ同様であるから，ここには8月1日に放下された卵（雌魚の全長 124mm）について記述する．

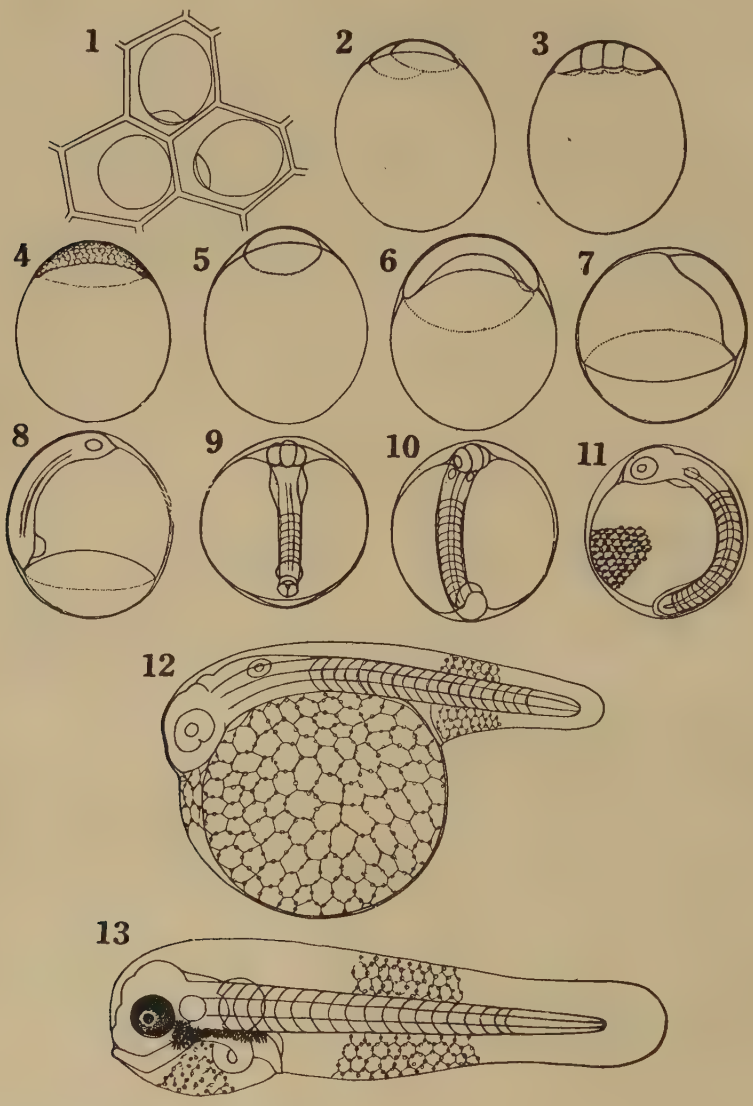
放卵後 40分で胚盤の隆起が完成し，1時間20分で第1分裂（2細胞期，Fig. 2），1時間40分で第2分裂（4細胞期），2時間5分で第3分裂（8細胞期，Fig. 3），2時間25分で第4分裂（16細胞期）が見られ，4時間25分で Morula 期（Fig. 4），20時間35分で Blastula 期（Fig. 5）に達する．26時間30分で胚皮は卵黄球の約1/3を掩う（Fig.6）．32時間5分後に胚皮は卵黄径の約1/2を掩い，胚体の原基が明瞭に見られ（Fig. 7），33時間50分後には眼胞が出来ている．35時間20分後には脊索及び Kupffer 氏胞が認められる（Fig. 8）．37時間20分後には筋肉節6～7個が数えられ，原口が閉じようとしている（Fig. 9）．39時間50分後には眼球を生じ，筋肉節10～12個が見られる（Fig. 10）．この時期に寒天状物質の凝集力が弱まり，卵粒は脱落して自由分離浮游卵になつて水槽の表面に浮んだ．41時間40分後には耳嚢が形成され，Kupffer 氏胞は消失し，筋肉節14～16が数えられる．47時間20分後には心臓の鼓動が見られ，胚体は胴部をゆつくり左右に動かしている（Fig. 11）．放卵後48時間20分で最初の孵出が見られた．卵発生中の飼育水温は 26.8～27.4°C であつた．卵帯から脱落して水面に浮游している卵も卵帯中に止つていた卵も孵化までの所要時間には殆ど差は見られなかつた．寒天状物質の凝集力がいちじるしく弱くなつているのでこの中で孵出した仔魚は尾部の運動によつて簡単に脱出する．卵発生の全期を通じて色胞は全く現われないが，孵化前になると卵黄上に亀甲状の網目模様と光を屈曲する小円点が現われる．

仔　　魚

孵化直後の仔魚（Fig. 12）は全長 0.88～1.00mm，卵黄径 0.49～0.59mm，筋肉節数 10＋8～9＝18～19 であつた（この魚の成魚の脊椎骨数は 10＋8＝18 である）．口はまだ開かず，目に黒色胞もない．胸鰭の原基が僅かに形成され，肛門は魚体の前方からほぼ2/3の所，第10～11筋肉節下に開口する．仔魚膜鰭は幅狭く，後頭部に始まり卵黄後縁に終る．卵黄及び仔魚膜鰭上に不規則な六角形又は五角形の亀甲状の網目模様があり，その模様の上に淡黄白色の輝点が無数にある．この輝点以外には色胞は全くない．孵化直後の仔魚は卵黄を上にして水面直下に仰むけに浮んでいて時々尾部を左右に振るが全く前進しない．

孵化後24時間の仔魚は全長 1.41～1.53mm，卵黄径 0.30～0.35mm，筋肉節数 4～5＋14＝18～19．孵化直後の仔魚の肛門は魚体の前方から約2/3の所に開口しているが，この時期の仔魚では魚体のほぼ中央，第4～5筋肉節下に開口している．黒色胞が目の後方から腸管の周辺にかけて現われ始めている．この時期の仔魚は仰むけに水の中層又は表層に浮んでいるが，水の表層を正位の姿勢で僅かに泳ぐことも出来る．

孵化後 48 時間の仔魚は全長 1.65～1.71mm，卵黄径は 0.21～0.27mm で口が出来始めている．樹枝状黒色胞が眼の上方から胴部下面，腸管の周辺にかけて発達し，前頭部にも1～2個の黒色胞が見られる個体もある．



ハナオコゼの産卵習性と初期発生.

Developing eggs and hatched larvae.

1) Before cleavage, 1 hour after spawning. 2) 2-cell stage, 1hr. 20 min. 3) 8-cell stage, 2 hr. 5 min. 4) Morula stage, 4 hr. 25 min. 5) Blastula stage, 20 hr. 35 min. 6) 26 hr. 30 min. 7) Formation of embryonal body, 32 hr. 5 min. 8) Eye balls and Kupffer's vesicle formed, 35 hr. 20 min. 9) 6-myotome stage, 37 hr. 20 min. 10) Optic lens and otosysts formed, 39 hr. 30 min. 11) Just before hatching, 47 hr. 20 min. 12) Newly hatched larva, 0.88 mm in total length. 13) 4 days old larva, 1.73 mm in total length. Networks on the yolk and larval fins are partially drawn.

72時間後の仔魚は全長 1.69～1.76 mm，卵黄径 0.1 mm で口は完全に開き，目に黒色胞が現われている．腸管の発達がいちじるしい．

96時間後の仔魚（Fig. 13）は全長 1.71～1.73 mm で卵黄は 80 時間前後で吸収し尽され，腸の蠕動が見られる．

水の中層に浮んで静止しているものも水底に沈下しているものもある．卵黄吸収後 5～6 日生存する個体もあつた．

参考文献

Gudger, E. W., 1937. Sargasso weed fish "nest", made by flying fishes not by sargasso fishes (Antennariids): A historical survey. Amer. Natur., **71**: 363–381.

神谷尚志，1913. 館山湾に於ける浮性魚卵並に其稚児，第2報．水産講習所試験報告，**18**(3): 11–12.

倉上政幹，1913. アンコウ（*Lophius*）の卵及び仔魚に就いて．水産研究誌，**8**(5): 175–177.

Mosher, C., 1954. Observations on the spawning behavior and the early larval develoment of the sargassum fish, *Histrio histrio* (Linnaeus). Zoologica, **39**(4): 141–152, 3 pls.

中村秀也，1933. ガラスを通して見た水族の生態の観察．楽水会誌，**28**(11): 11–12.

Nair, R. V., 1952. Studies on some fish eggs and larvae of the Madras plankton. Proc. Ind. Acad. Sci., **35**(5): 181–208, 1 pl.

末広恭雄，1938. アンコウの習性特にその食性に就て．日本水産学会誌，**7**(4): 240–243.

内田恵太郎，1924. 寒天状物質に包まれた硬骨魚卵．水産学会報，**4**(3): 179–181.

Résumé

Pterophryne histrio (Linné) is one of the sargassum fishes, widely distributed in the warm seas of the world. In 1954, Mosher had observed the spawning behavior of this fish. In the present paper it was reported the results of the repeated observations with some different fact.

From July to September, in 1955 and 1956, the senior author observed the spawning behavior and the egg development of this fish at the Mekari Aquarium in Moji City, Fukuoka Pref. and also reared the hatched larvae for 10 days in a glass jar.

The eggs were imbedded in gelatinous substance, lying in 2 or 3 layers, each egg separated in a small hexagonal or pentagonal compartment, forming a transparent egg-mass. The eggs rotated freely in these compartments. In the course of development, at 6～11 myotome stages, the firm membranes of the compartment began to decay, and some eggs left the gelatinous substance.

The egg is elliptical in shape, measuring 0.53～0.57 × 0.62～0.65 mm in diameter, lacking oil-globule.

Half a day or one day before spawning, the abdomen of the female became greatly distended. The courting behavior of the male began in the morning and continued until spawning. The spawning occurred from at 4.00 to 8.00 p. m.

in every occasion. At the spawning, the female dashed upward to the water surface, the males following close behind her, resulting in spawning. One of the males dashed into the egg mass and carried it. The authors observed that the male hold an edge of the egg mass in his mouth.

The hatching took place in 48 hours and 20 minutes after spawning at the water temperature 26.8～27.4 °C. In the whole course of development no chromatophore appeared.

The newly hatched larva, measuring 0.88～1.00 mm in total length, had 18～19 (10+8～9) myotomes, lacking melanophore. Minute hexagonal or pentagonal networks, with a small yellowish spot on the corner of the net, were found on the surface of the yolk and larval fin.

In four days almost of the yolk was absorbed and the larva attained 1.71～1.73 mm in total length. Melanophores were found around the intestine and in the rear side of the eye, but none on the tail nor on the back of the trunk.

Fisheries Laboratory, Faculty of Agriculuture,
Kyushu University

ムスジガジの産卵習性と幼生飼育

藤田 矢郎・内田恵太郎

Breeding habits and rearing of larvae of a blennioid fish, *Ernogrammus hexagrammus* (Temminck et Schlegel)

Shiro Fujita and Keitaro Uchida

九州大學農學部學藝雜誌, 第17巻 第3号, 別刷, 昭和34年12月20日

Reprinted from the Science Bulletion of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 17, no. 3, December 20, 1959

ムスジガジの産卵習性と幼生飼育[1,2)]

藤田 矢郎・内田恵太郎

Breeding habits and rearing of larvae of a blennioid fish, *Ernogrammus hexagrammus* (Temminck et Schlegel)

Shiro Fujita and Keitaro Uchida

はしがき

ムスジカジ *Ernogammus hexagrammus* (Temminck et Schlegel) はギンポ亜目タウエガジ科 Stichaeidae の小魚で本邦では北海道から九州地方まで分布し，岩礁性海岸の最大干潮線附近の石の下に潜んで棲んでいる．ギンポ亜目魚類の卵及び産卵習性については今まで多くの研究がなされ，卵が卵塊を形成するものと，他物に一層に産みつけられるものとがあり，何れの場合も親魚が卵群を保護することが知られている．しかしムスジガジ及びタウエガジ科の魚の産卵習性や幼期の形態，習性などについてはまだ明らかにされていない．筆者の一人藤田は 1957～1959 年の春，下関市長府沖の満珠島の礁で本種の卵塊を採集し，この卵から孵化した仔魚を門司市立和布刈水族館で約 40 日間飼育観察したので産卵習性及び仔稚魚期について報告する．

材料及び飼育方法

1959 年 2 月 24 日に親魚によつて保護されていた卵塊を採集し，この卵から孵化した仔魚を直径 350 mm，高さ 250 mm のガラス鉢に 156 尾収容し，熱帯魚飼育用の小型気泡導入器を用い昼夜送気を行い，曝気と飼育水の流動に伴う餌の均一分布化に留意した．飼育水は室温に放置し，水温は 14～18.5°C であつた．飼育水は 4～5 日に 1 回位適時取り換えた．本仔魚は水温の瞬間的急変（1.5°C 以上）に対しては弱いので換水には特に注意を要した．餌としてブライン・シュリンプの孵化幼生を孵化直後から投与した．飼育水中の餌の濃度は 100 cc 中 90 尾前後のとき最もよく餌付きするのが観察されたので終始この程度に保つた．

産　　卵

産性卵　1957 年～1959 年の満珠島に於ける産卵期は 1 月下旬から 3 月下旬と考えられた．

1) 1959 年 4 月，日本水産学会年次大会にて講演（東京）．

2) 九州大学農学部水産学教室業績．

Fig. 1. ムスジガジの産卵習性と幼生飼育
Spawning ground at Manju-shima Islet, Shimonoseki City, Yamaguchi Prefecture.

産卵習性 1957年3月15日に1卵塊，1958年3月7日に1卵塊，1959年2月24日に2卵塊採集したが，産卵は1～3月の大潮の最大干潮線付近の石（20～50×20～30×20cm位）の下で行われていた（Fig. 1）．卵は淡乳白色の卵塊をなし，雄親魚によつて保護されていた（卵塊保護中の親魚を採集解剖して生殖巣中に精子の存在を確認した）． 1例に於ては卵塊は最大干潮線よりやや高く（2時間露出線位の所）海水が完全に干上つた石の下で発見され，保護中の雄親魚は卵塊の側で体を真直に延していた．

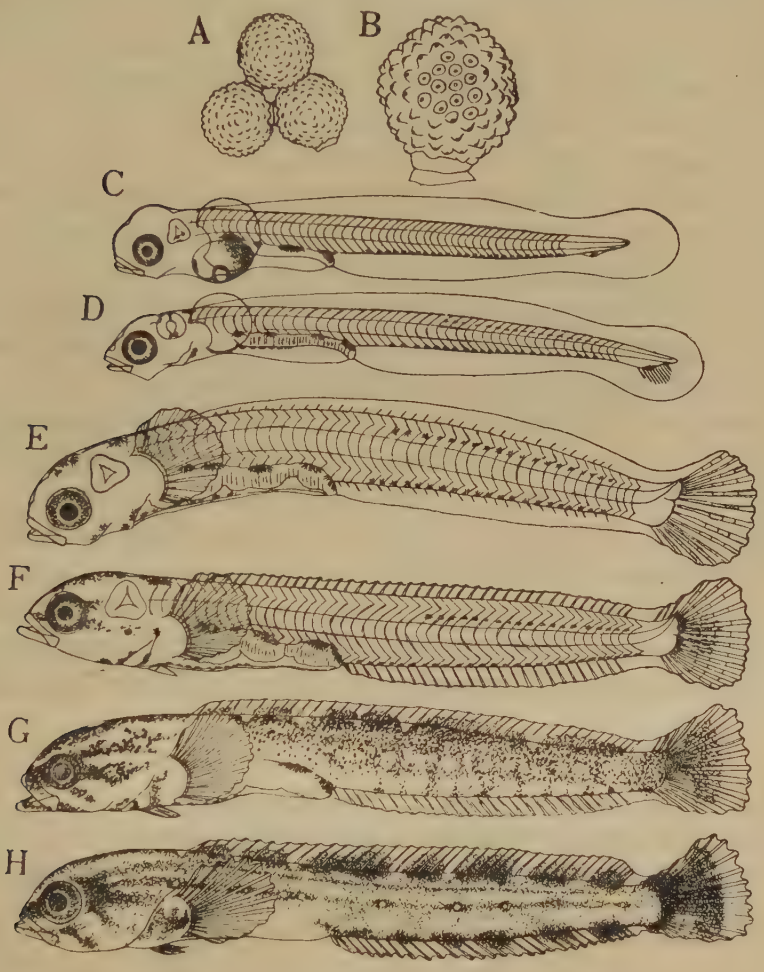
卵及び卵発生

卵 卵（Fig. 2, A, B）は凝集粘着卵で，直径30mm前後のほぼ球形の卵塊をなすが，卵塊が他物に付着することはない． 1卵塊中の卵数は4卵塊採集中2卵塊測定したが，738個と769個であつた．発生後期の受精卵では卵膜は淡乳白色を呈し，不透明に近い半透明で外部から胚体の状態を観察することは殆ど出来ない．卵膜の表面には無数の円錐形の疣状突起物（基底部の径0.23～0.25mm，高さ0.1mm）が発達し，卵は金米糖状を呈する．卵径2.3～2.45mm，卵黄は無色透明で特殊な構造はなく，中に無色透明な油球1個を有する（発生初期の油球の数は1個であつたか否かは不明である）．

卵発生 1957年3月15日及び1959年2月24日採集の卵は採集直後孵化し始めたが，1958年3月7日採集の卵は採集後孵化するまで約8日間水温13～17°Cの実験室の水槽中で止水飼育した．この卵は採集直後卵膜を破つて発生段階を確めると，筋肉節数47（15＋32）が数えられ，胚体の全長は5.95mm，卵黄径1.6mm，油球径0.55mm（1個）で，胸鰭の原基が現われ，頭部に多数の孵化酵素腺が見られた．目に黒色胞があるほか，胚体

上に色胞は全く見られない．採集後約5日で胚体長 7.8mm になり，腸管背縁に数個，尾部腹面腹中線に沿つて1列に小黒色胞が現われていた．

発生初期の天然卵をまだ採集していないので孵化までの所要時間は不明であるが，水温 9～13°C の天然状態では約1カ月を要するのではないかと考えられる．



ムスジガジの産卵習性と幼生飼育 (Fig. 2)

Fig. 2. Eggs and reared larvae.

A) Part of egg mass. B) One egg. C) Larva newly hatched, 9.25 mm in total length. D) Larva 4 days old, 9.65 mm, yolk is entirely consumed. E) Post-larva, 16 days old, 12.0 mm. F) Post-larva, 23 days old, 12.7 mm, ventral fin formation. G) Post-larva, 25 days old, 13.0 mm, melanophores almost all over the body. H) Juvenile, 34 days old, 13 mm.

孵化仔魚

孵化直後の仔魚（Fig. 2, C）は全長 8.75～9.25mm, 筋肉節数 15+30～32=45～47, 卵黄径 0.9mm, 油球径 0.15mm で口は開き，膜鰭は後頭部から始まり，胸鰭も既に形成されている．卵黄の後半部に泡沫状構造が見られる．油球は卵黄の中央下に位置し，その一部が卵黄表面から突出している．肛門は魚体の前方から約 2/5 の所に開口している．腸管背縁に左右 2～3 対，肛門直上腸管背縁に 1 個，卵黄前端及び卵黄直後方の腸管腹面に 1 個の樹枝状大黒色胞が見られ，尾部腹面腹中線に沿つて 1 列に小黒色胞が並ぶ．頭部背面に小黄色胞が点在するほか，魚体背面に色胞は全くない．

孵化後 4～5 日で卵黄を吸収し尽し，全長 9.65mm（Fig. 2, D）に達した．腸管周辺の黒色胞はよく発達し，尾部腹面腹中線上の黒色胞のほかに，新たに後頭部背面に 1 個，尾部の背部体側に 1 列に 16～20 個，尾下骨の原基上に 1 個黒色胞が現われている．頭頂から胴部背面及び尾部背面の黒色胞のある部分に淡い青緑色胞が見られる．

孵化後 13 日全長 10.5 mm の後期仔魚では胸鰭に 13 条，尾鰭に 14 条の鰭条が数えられ，仔魚膜鰭内に背鰭及び臀鰭の鰭条原基が現われ始めている．腸管背縁に 5 個の大形黒色胞がある．頭部から尾部後端に至る魚体背面に淡黄青色胞が見られる．

孵化後 16 日全長 12mm の仔魚（Fig. 2, E）では背鰭に 36～37 個，臀鰭に 27 個の鰭条原基が数えられ，尾鰭々条には 3 列に軟条節が見られる．頭頂，鰓蓋部及び尾鰭々条部に新たに黒色胞が現われている．

孵化後 23 日全長 12.7mm の仔魚（Fig. 2, F）では腹鰭の原基が形成され，吻部に始まり目の後方で 2 条に分れる黒色胞帯が見られる．

孵化後 25 日，全長 13mm の仔魚（Fig. 2, G）では胴部腹面を除く魚体全面に急激に黒色胞及び橙色胞が発達し，魚体は黒褐色を呈する．目の後方に 3 条の黒色胞帯，背鰭上に 6～7 個の黒色胞群，尾鰭上にT字型の黒色帯が現われている．背鰭 40 棘，臀鰭 1 棘 27 軟条が数えられる．

孵化後 34 日，全長 13mm の個体（Fig. 2, H）では頭部に 4～5 条の黒色胞帯，背鰭上に 7 個，臀鰭上に 5 個の黒色胞群がある．背鰭基底部体側背面に 8 個の白色斑，胸鰭基底上方より尾柄部に至る体側正中線に沿つて 9 個の白色点が見られる．背鰭 40 棘，臀鰭 1 棘 27 軟条，胸鰭 13 軟条，腹鰭 5 軟条が数えられ各々定数に達し，ほぼ稚魚期に達したものと考えられる．

飼育中の仔魚の習性

卵から孵化した仔魚は天然状態では孵化直後から海面直下を泳いでいる．実験室の飼育槽中でも明るい時は容器の中層や水面近くを尾部を振動させて泳ぎ器底に沈下することはない．しかし夜間や昼間でも遮光して暗くすると仔魚は全部器底に沈下する．

孵化直後から 22 日頃までは仔魚は昼間器底に沈下することは殆どなかつたが，孵化後 20 日頃から仔魚を強く驚かすと器底に沈下してしばらく浮上しなくなる様になつた．孵化後 23 日の仔魚には腹鰭の原基が見られ，普通の状態でも器底に沈下していることが

多くなつた．しかし，頭部に黒色胞帯が現われ始めている以外色胞の分布状態には殆ど変化はない．孵化後 25 日の仔魚は，その前日の夕方まで頭部以外には顕著な色胞は認められなかつたが，黒色胞及び橙色胞が魚体全面に発達し，仔魚は黒褐色を呈するに至り，器底を離れて游泳することは殆ど見られなくなつた．浮游生活から完全に底棲生活に移行したものと考えられる．天然状態でもこの時期にシラス型の浮游生活を終り底棲生活に入るものと考えられる．

餌付き　孵化直後から仔魚はブライン・シュリンプの孵化幼生に餌付きし，腸管にブライン・シュリンプの幼生が一杯になるまで食う．仔魚は器底に沈下した餌や水面に浮上したものには全く餌付きしない．餌付きの動作は餌に対して水平又はやや斜下方から体を二重にくねらせてスプリングの様にして飛びかかる．しかし，遮光して真暗にすると仔魚は全く餌付きしない．朝早く見ると仔魚の腸管が完全に空になつているが，夜間は器底に沈下していて餌付きしないものと思われる．

孵化後 18 日全長 12～12.5 mm の仔魚（浮游生活から底棲生活に移る少し前の時期）の観察によると，攻撃姿勢を整え餌に飛びかかる時の餌と魚体前端との間隔は多くの場合，体長の 2/10～3/10（2～3 mm）であつた．攻撃姿勢を整える前に餌を発見して餌に接近する動作が見られる場合が多いが，その時の始めの餌と魚体前端との間隔は遠い時でほぼ体長（10 mm）に等しく，多くは体長の 5/10～6/10（5～6 mm）位であつた．餌の発見が視覚によることはほぼ明らかであるから，ブライン・シュリンプの新しく孵化した幼生程度の大きさ（0.2～0.25×0.5 mm）の餌を発見するには約 10 mm 以内に仔魚が接近しなければならないと思われる．このことは餌育水中のブライン・シュリンプ幼生の濃度が 100 cc 中 90 尾前後以上の時よく餌付きすることと符合する．又摂餌の姿勢を整えて餌を攻撃しても必ず成功するとは限らず，その成功率は 6/10～7/10 程度であるのが見られた．

孵化後 25 日前後で仔魚は浮游生活から底棲生活に移つたが，この時から殆ど完全にブライン・シュリンプ幼生には餌付きしなくなり，其後 10～15 日（孵化後 40 日前後）で全部死亡した．

参考文献

Abel, E. F., 1955. Freilandbeobachtungen an *Callionymus festivus* Pall. und *Tripterygion tripteronotus* Risso, zwei Mittelmeerfischen, unter besonderei Berücksichtigung des Fortpflanzungsverhaltens. S. B. öst. Akad. Wiss., **1** (164) : 817–854.

Berner, L., 1946. Lerupition dentaire chez *Blennius palmicormis* C. et V. Bull. Soc. Zool., **70** : 156–158.

Brown, E. M., 1929. Notes on the breeding habits and early larvae of the tompot blenny. Proc. Zool. Soc. London, **3** : 487–489.

Breder, C. M., 1939. On the life history and development of the sponge blenny, *Paraclinus marmoratus* (Steindachner). Zoologica, **24**(31) : 487–496.

————, 1941. On the reproductive behaviour of the sponge blenny, *Paraclinus marmoratus* (Steindachner). Zoologica, **26**(22) : 233–236.

Cipria, G., 1934. Uova stadi embrionale e post-embrionale di *Blennius palmicornis* Cuv. R. Comit. Talasso. Italiano, Mem., **218** : 1–12.

————, 1936. Uova stadi embrionale e post-embrionale nei Blennidi. I. *Blennius pavo* Risso, II. *Blennins inaequalis* C. V. R. Comit. Talasso. Italiano, Mem., **231**: 1–8.

Eggert, B., 1929. Entwicklung und Bau eier von *Salarias flavo-umbrinus* Rupp. Zool. Anz., **83**: 241–252.

Ford, E., 1922. On the young stages of *Blennius ocellaris* L., *Blennius pholis* L. and *Blennius gattarugine* L. J. Mar. Biol. Ass. United Kingdom, **12**: 688–692.

Gudger, E. W., 1927. The nest and nesting habits of the butter fish or gunnel, *Pholis gunnellus*. Nat. Hist., Am. Mus., **27**: 65–71.

Guitel, F., 1893. Observations sur les moeurs de trois blenniides, *Clinus argentatus*, *Blennius montagi* et *Blennius sphynx*. Arch. Zool. Exp. Gen., **3**(1): 325–384.

桧山義夫, 1938. サザエの殻に産卵するニジギンポ *Petroscirtes trossulus*. 植物及び動物, **6**(5): 901乃至 904.

Lebour, M. V., 1927. The eggs and newly hatched young of the common blennies from the Plymouth neibourhood. J. Mar. Biol. Ass. United Kingdom, **14**(3): 647–650.

McIntosh, W. C. and Masterman, A. T., 1897. The lifehistory of the British Marine foodfishes. London, 200–217.

McIntosh, W. C., 1905. On the life-history of the shanny (*Blennius pholis* L.). Zeits. Wiss. Zool., **82**: 368–377.

水戸 敏, 1954. カエルウオ *Salarias enosimae* の産卵習性. 魚類学雑誌, **3**(3, 4, 5): 144–152.

Munro. I. S. R., 1955. Eggs and larvae of the sabretoothed oyster blenny, *Dasson steadi* (Whitley) (Blenniidae). Aust. J. Mar. Freshw. Res., **6**: 30–34.

Pieron, H., 1914. Quelques observation sur les moeures du *Blennius ocellaris* L. Bull. Mus. Nat. Hist. Paris, **20**: 13–15.

Qasim, S. Z., 1956. The spawning habits and embryonic development of the shanny (*Blennius pholis* L.). Proc. Zool. Soc. Lond., **127**: 79–94.

Schultz, L. P. and Delay, A. C., 1932. The eggs and nesting habits of the crested blenny, *Anoplarchus*. Copeia, Oct. 7, 1932, (3): 143–146.

内田恵太郎, 1930. 魚類, 円口類, 頭索類. 岩波生物学講座, 67–68, 73–74.

————, 1941. 魚卵の生態. 海洋の科学, **1**(3): 14.

矢部 博, 1936. ナベカ *Petroscirtes elegans* Steindachner の産卵習性並びに稚魚に就て. 水産学会報, **7**(3): 73–79.

Résumé

Ernogrammus hexagrammus (Temminck et Schlegel) is a small blennioid fish, hiding under the stones lying in the tidal zone of rocky coasts, distributing from Hokkaido to Kyushu in Japan.

The authors collected the egg masses of this fish at Manju Islet in Shimonoseki City on March 15, 1957, March 7, 1958 and February 24, 1959 and reared the hatched larvae for about 40 days in the glass jar feeding with brine shrimp nauplii.

The spawning season seems to extend from January to March in the vicinity of Shimonoseki City.

The eggs (Fig. 2, A) are sticking to each other to form a small spherical egg mass (about 30 mm in diameter), not adherent to any other substance. The spawned egg mass is laid under the stones lying near the low tide water mark, where it is guarded by a male parent fish. The individual egg (Fig. 2, B) is spherical, measuring 2.3～2.45 mm in diameter with a single oil-globule. The yolk and oil-globule are colorless. The egg membrane is almost opaque and pale milky white with a number of small wartlike structures on the surface.

The developing eggs at 47-myotome stage, with hatching enzyme glands on the head of embryonal body, collected on March 7, 1958, were reared in the tank. The hatching took place in about 8 days after being collected at the water temperature 13～17.5°C.

The newly hatched larvae (including the one of Fig. 2, C) are 8.75～9.25 mm in total length, with an oil globule situated at the middle part of the yolk and partly protruding from its surface. The myotome number is 15+30～32=45～47. The larvae fed actively on the brine shrimp nauplii in the day time, but in dark they did not feed at all.

In four or five days the yolk was entirely consumed and the larva measured 9.65 mm (Fig. 2, D). For about twenty days after hatching the larvae lived a swimming life in the day time, settling down to the bottom of glass jar in the dark place or at night. In 23 days after hatching the rudiments of ventral fins were formed(Fig. 2, F). In 25～30 days after hatching, melanophores and orange pigment cells suddenly appeared almost all over the body, and the larvae (including the one of Fig. 2, G), now 12.7～13.0 mm in total length, entered into the bottom life. These larvae scarcely fed on the brine shrimp nauplii. In 34 days after hatching the larvae (Fig. 2, H), 13 mm in total length, reached early juvenile stage.

Fisheries Laboratory, Faculty of Agriculture,
Kyushu University.

流れ藻の海藻学的研究–I
津屋崎近海流れ藻の周年変化

瀬川宗吉・沢田武男・檜垣正浩・吉田忠生

Studies on the floating seaweeds - I
Annual vicissitude of floating seaweeds in the Tsuyazaki region

Sokichi Segawa, Takeo Sawada, Masahiro Higaki and Tadao Yoshida

九州大学農学部学芸雑誌，第17巻 第1号，別刷，昭和34年3月28日

Reprinted from the Science Bulletion of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol 17, no. 1, MARCH 28, 1959

流れ藻の海藻学的研究–I[1)]
津屋崎近海流れ藻の周年変化[2)]

瀬川宗吉・沢田武男・檜垣正浩・吉田忠生

Studies on the floating seaweeds - I
Annual vicissitude of floating seaweeds in the Tsuyazaki region

Sokichi Segawa, Takeo Sawada, Masahiro Higaki and Tadao Yoshida

I. 緒　　言

流れ藻が或種重要魚類の産卵や稚魚の生活基盤として，ある役割を果していると言うことは以前から考えられていたことである．しかし流れ藻の海藻自体や，それに付随する魚類などについての具体的な知識は非常に乏しい．Parr (1939) は北大西洋西部における流れ藻の種類相と定量的研究を行つた．日本においては木村 (1957) がサンマの産卵に関連して行つた結果について報告している．しかしなお解明すべき点は多くの面で残されている．

われわれは 1957 年 3 月，流れ藻に関する綜合的な研究の一部として藻類の面から見た流れ藻の研究に着手し，以後津屋崎やその他の場所で機会を見ては採集を行い現在に至つている．そのうち本報では津屋崎近海で 1 年間通して採集した流れ藻につき，その種類相および種類組成の季節的周年変化について報告したい．

北部九州は壱岐・対馬両水道を経て日本海に流入する対馬暖流の入口に当たつている．この水系における魚類の産卵・回遊などの生態から考えて壱岐・対馬方面の調査が当然望ましいが，一方かなり沿岸に見られる流れ藻についても沖合のものとは別の意味で明らかにする必要がある．ここに津屋崎の比較的近海を選んだのは，それが対馬暖流に限らず，沖合とごく近海の流れ藻を比較する際の基礎的資料としても必要と考えたからである．

本文に入るに先立ち，種々便宜を計つていただいた九大水産実験所所長内田恵太郎教授ならびに所員の方々に謝意を表する．

II. 方　　法

調査は津屋崎の海岸に生育，あるいは打上げられる種類についてのものと，近海の流れ藻についてのものに分かれる．前者は以前から行つていたが，後者は 1957年 3 月に着手した．

1) 九州大学農学部水産学教室業績，九州大学農学部附属水産実験所業績．

2) 日本水産学会年会 (1958 年 3 月，東京) で発表した．

流れ藻の採集は津屋崎の九大水産実験所を根拠地とし，所属の約5tの調査船で行つた．採集には船の往復の時間も含めて，3～4時間しか費すことができなかつた．これは以下に述べる内容の調査をその日のうちに完了する必要からである．調査期間中，流れ藻を採集した地点は図に示す通りであるが（Fig. 1），これらの点はそれぞれの採集時に潮目と思

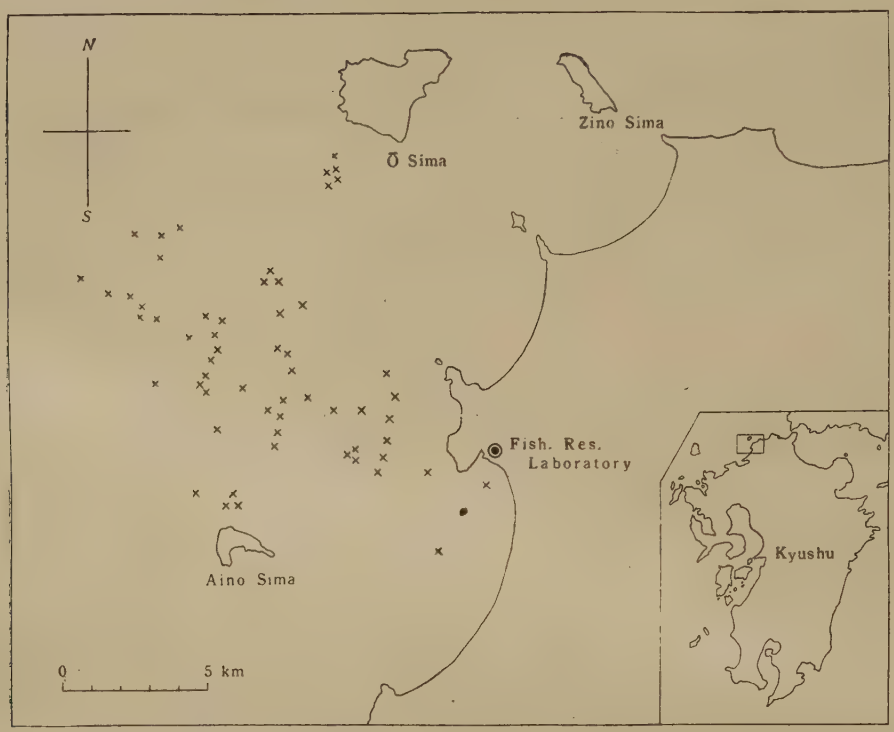


Fig. 1. Map of Tsuyazaki and its vicinity. Crosses represent the positions where the floating seaweeds were hauled in, from March, 1957 to March, 1958.

われる場所が多く，多数の流れ藻を始めそれ以外の流木やあわなどが集まつていた．原則として毎月2回採集を行つたが，天候その他の事情で1回しか行わなかつたこともある．Woodcock（1950）は 4 m/sec 以上の風がある時，それによつて生ずる表面水の下降流のために，浮遊ボンダワラ類のなかには表面下に沈むもののあることを報告しているが，われわれの調査船ではこの程度以上の天候時には調査が困難であつた．

船には4名あるいはそれ以上が乗組み，航行中に流れ藻のかたまりが見つかると船を横付けにし，すくい網（約3×3.7 m）で流れ藻の下を泳いでいる魚類やその他の生物と共にすくい上げた．この際各種の稚魚を採ることができたが，これらについては別に研究がなされている（内田・庄島 1958）．

かたまりの非常に大きい場合は1部分を，また網に入る程度のものは全部をとり上げ，できるだけ離れたもの3～6個を採集して実験所に運んだ．持ち帰つた材料はそれぞれの

かたまりごとにより分けて個体を取出し，種類別にした後全個体について次の各項目を調べた．すなわち根の有無，切れた部分，生殖器床の有無および成熟の度合，新鮮度，全長，生重量などである．鮮度は外観によつてすでに変色したものから新しいものまでを4段階とし，別に切口についても同様に記録したが，両者は必ずしも一致するものではない．生重量は 5g を単位とした．

III. 結　　果

1. 生育・打上げおよび流れ藻に出現するホンダワラ類の種類

研究を始める以前より，津屋崎の岩礁地帯に生育しているホンダワラ類の種類，および海岸に打上げられる種類については調査を行つていたが，これらを流れ藻に出現する種類と比較するため第1表に示す (Table 1).

Table 1. Comparison of the fucaceous algae obtained in various conditions in the Tsuyazaki region.

Species	Living on shore	Cast up ashore	Floating offshore
Cystophyllum sisymbrioides	+	+	+
C. turneri	+	+	+
Hizikia fusiforme	+	+	*
Sargassum piluliferum	+	+	+
S. patens	+	+	+
S. horneri	+	+	+
S. filicinum	—	+	+
S. serratifolium	+	+	+
S. tortile	+	+	+
S. ringgoldianum	+	+	+
S. confusum	+	+	+
S. fulvellum	+	+	+
S. thunbergii	+	+	*
S. kjellmanianum	+	+	*
S. hemiphyllum	+	+	*
S. micracanthum	+	+	+
S. nigrifolium	+	+	*
S. (*Eusargassum*) spp.	—	*	*
Coccophora langsdorfii	+	+	—

* Small amount.

この表から，これらは互に非常によく似ていることがわかる．打上げの材料となつたものは恐らく比較的近くの海岸からとり去られたものが相当の割合を占めると思われるので，生育種と打上げ種の類似は当然であるが，このような種類相を持つ地域は北部九州にかなり広汎にわたると思われることから，以上の結果では流れ藻の起源を推定することは困難である．ただし注目すべきは *Eusargassum* 亜属の類が量的に非常に少なかつたこと

で，この類が九州南部以南に分布区域を持つていることから推して，その起源が少なくとも九州南部のような南の海域でないことを思わせる．

2. 主要種の重量組成の季節変化

船で採集した3～6個のかたまりを1回分として集計し，各種類について百分比の重量

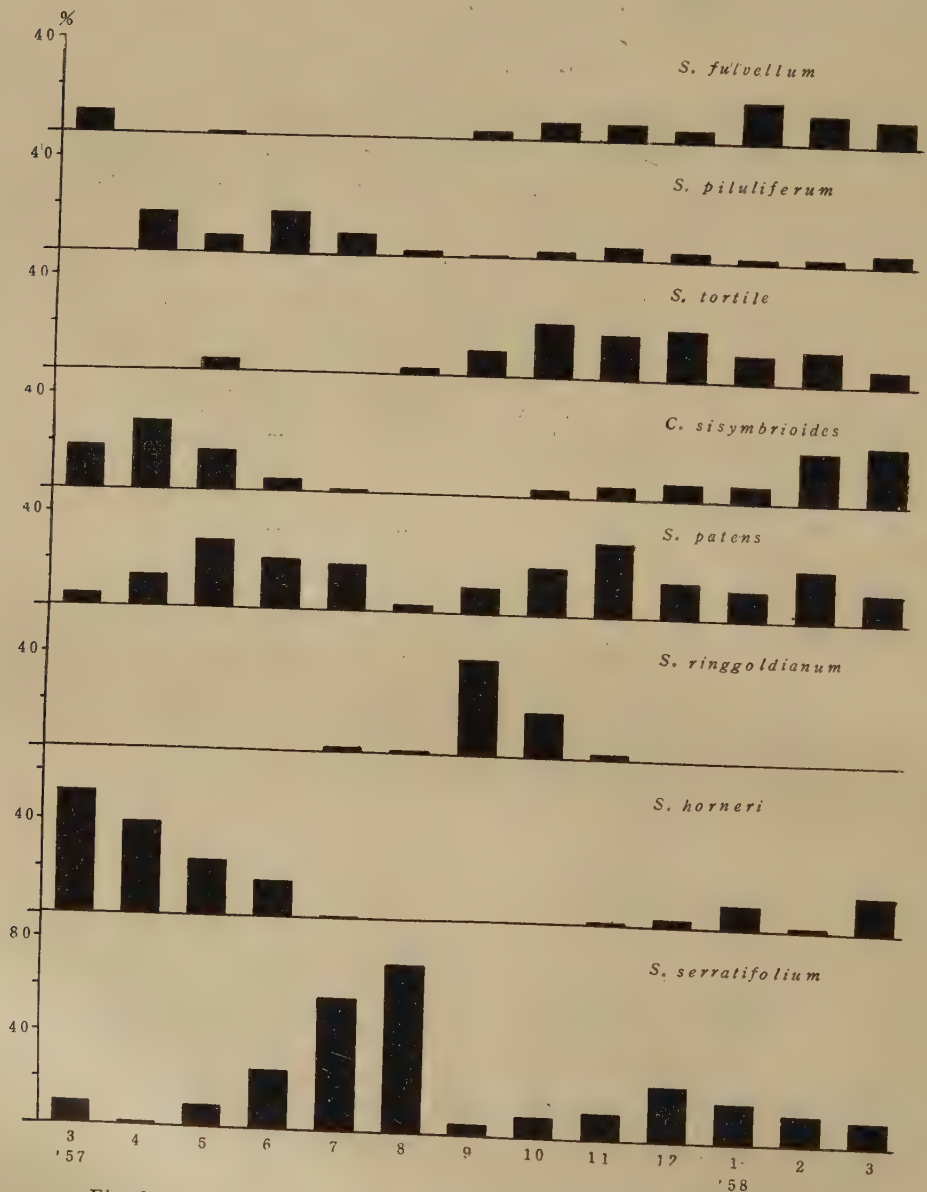


Fig. 2. Seasonal changes of the quantitative composition in major species, represented by mean value of survey every month. Remarkable vicissitude is observed.

組成に表わした上その季節的変化・消長を調べた．持ち帰った材料は毎回かなりの差があり，大きいものでは 150 kg，小さいものでは 15 kg のこともあつたが，図に示した結果は1年間に調査した 1 t 強の材料によつたものである (Fig. 2).

この図を概観すると，流れ藻を構成する多くの種類は時期によつてかなり明らかな消長を示していることがわかる．消長の模様には非常にはつきりしたものからそれ程の変化を示さないものまでいろいろ段階がみられるが，非常にはつきりしたものでは1年生のアカモク，ホンダワラ，多年生のジョロモク，オオバモクが顕著であり，それ程著しくないものではヤツマタモク，マメタワラがあげられる．消長のはつきりした種類を時期的にみると，それらは四季のうち1時期に特に出現するもので，春にはアカモク，ジョロモク，夏にはノコギリモク，秋にはオオバモク，冬にはホンダワラがそれぞれ規則的に割合を増しており，各時期における指標種ともなつている．このような時期はそれぞれの種類が個体としてじゆうぶん生長し，成熟した時とも一致していて，同時に生殖器官をつけた個体は未熟なものに較べて非常に重いものであることもわかつた．

この経過は流れ藻の種類組成の変化を予測する資料とすることができるが，現在この結果を追試するためひき続いて調査を行つている．

IV. 考　　察

流れ藻の研究を，その中に出現する種類およびその季節的消長に限つても必然的に多くの問題を派生するが，ここにそれらを流れ藻の量と気象要因の両者の関係にしぼつて考察を行いたい．

浮遊する流れ藻は，沿岸に生育したものがある部分から切れ，打上げられずに沖に集まつたものと，他の地方から海流や風などで運ばれたものとからなると思われる．この量は毎日持ち帰つた採集物の量とはもちろん関係ないが，航行中船から観察した時の印象では春から初夏の頃が最も多量であり，秋の前後はそれに較べると非常に少ないことが指摘できる．このことは生育ホンダワラ類の量と，1個体の大きさにもよるもので，量の多くなる春から初夏に繁茂する種類は個体として大きくなるものの多いのは前述の通りである．すなわちアカモク，ノコギリモクは数メートルにもなり，多数の枝を持つが，これに反し秋のオオバモクはわずかに1mを越える程度にすぎない．

生育ホンダワラ類の量とも関係あることはホンダワラの例が示す通りで，この種は規則的に1年周期の消長を示すにもかかわらず，冬期においてアカモク，ノコギリモクほどの割合を占めないのは恐らく生育資源量の少ないことによるものであろう．ホンダワラに限らず，潮間帯以深におけるホンダワラ類の量的問題については，今後潜水などによる生態調査を試みたいと思つている．

気象要因特に風と波のおよぼす影響は，主として流れ藻の浮遊している位置と量である．流れ藻の位置すなわち採集地点は第1図に示す通りで絶えず移動していることがわかるが，特に冬期北から西の風の続いた後は流れ藻が津屋崎のごく近くまで吹き寄せられたことがあり，反対に南よりの風の後には沖に押しやられたためか，かなり沖まで出ても見つからなかつたこともあつた．また風のある時は海面が波立ち，流れ藻を探すのも困難でかつ潮目も非常に見分けにくかつた．

風や波はまた流れ藻の量を左右する大きな原因と思われる．流れ藻の多い春ころの材料を観察してみると，それらは根あるいは枝の基部などの老朽化によつて切れたと考えるよりは，物理的に外囲の力によつてはぎとられたと思われるものが非常に多い．根のついた個体，あるいは根に石など基物の1部がついたものがその例であるが，このような事実は藻体が波の動揺に抗しきれなかつたためと考えざるを得ない．したがつて個体が立体的に大きいものほど波の作用を受けることになり，大型海藻の繁茂する時期には特に波などの天候条件が流れ藻の量を左右するものと思われる．1958年2月にアカモクが著しく減少しているのは，恐らく静穏な海の続いた後に採集したためであつて，初春によくある荒天の後ならば幾分かの増加をおく測することが許されよう．

以上のことから，採集当時の天候と前述の調査結果を考え合わせて標準的な重量組成変化を推定することは可能なことと思われる．

V. 要　　結

津屋崎海岸および津屋崎近海における生育・打上げ・流れ藻などのホンダワラ類を調査したところ，次のような結果を得た．

1. 生育・打上げ・流れ藻の種類を比較するとこれらは互に非常によく似ており，流れ藻の起源や生育地を推定させ得る特殊な種類は含まれていなかつた．

2. 近海の流れ藻を採集し，種類別の重量組成の変化を1年間概観してみると，それらは季節によつて明らかな消長が認められる．

3. 流れ藻の量は春から初夏のころが最も多かつたが，これはそのころ繁茂する種類に個体として大きくなるものがあることと，風・波などの気象条件が重なつているためと思われる．

文　　献

木村喜之助，1957．津軽海峡を通過するサンマについて．対馬暖流開発調査シンポジウム，**5**：207～211.

木村喜之助・堀田秀之・福島信一，1957．ナガレモ採集から見たサンマの産卵状態．日水会東北支部会報，**8**：31～32.

Parr, A. E., 1939. Quantitative observations on the pelagic *Sargassum* vegetation of the western North Atlantic. Bull. Bingham Oceanogr. Coll., **6**(7): 1～94.

内田恵太郎・庄島洋一，1958．流れ藻に関する研究．流れ藻に伴う稚仔魚-1，昭和32年度の津屋崎附近における調査．日水誌，**24**：411～415.

Woodcock, A. H., 1950. Subsurface pelagic *Sargassum*. J. Mar. Res., **9**: 77～92.

Summary

Since March, 1957, the authors have been engaged in studies of floating seaweeds with some reference to living and cast up materials. For collecting the floating seaweeds materials a rectangular scoop-net being ca. 3×3.7 m in

size was used. The surveys were carried out twice a month in general, on the facilities of the Fishery Research Laboratory of Kyushu University. Though the survey area was limited (Fig. 1), annual results are summarized as follows:

1) There was no significant difference in species among three sorts of materials; floating, cast up and living fucaceous algae (Tab. 1). Because the area having such a flora may spread widely to northern Kyushu, the origin of the floating seaweeds can not be supposed from this examination. But the fact of an unexpectedly little amount in *Eusargassum* species, characteristic *Sargassums* of warmer seas, shows that the floating seaweeds in this area are not of southern Kyushu origin.

2) From the quantitative composition of common species in floating seaweeds a remarkable seasonal vicissitude in each species is observed (Fig. 2).

3) The amount of floating seaweeds could not be determined precisely, but it seems more abundant from April to May, and less in autumn. It is due to the size of seaweeds, i. e. *Sarg. horneri*, one of the floating seaweeds with a spring fruiting period, often reaches over several metres in spring, whereas *Sarg. ringgoldianum*, a representative of the autumn materials, hardly grows over one metre even in its fruiting period of autumn. In addition, the weather condition is also another cause in making weeds float from their substrata. Without hard wind or strong action of sea water they would not be able to get free from their substrata, excepting they decay in the basal parts in afterlife.

流れ藻の海藻学的研究—II

対馬・北九州海域にみられる流れ藻

瀬川宗吉・沢田武男・檜垣正浩・吉田忠生

Studies on the floating seaweeds–II
Floating seaweeds found in Iki-Tusima region

Sokichi Segawa, Takeo Sawada, Masahiro Higaki and Tadao Yoshida

九州大學農學部學藝雜誌, 第17巻 第3号, 別刷, 昭和34年12月20日

Reprinted from the Science Bulletion of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 17, no. 3, December 20, 1959

流れ藻の海藻学的研究—II[1)]

対馬・北九州海域にみられる流れ藻[2)]

瀬川宗吉・沢田武男・檜垣正浩・吉田忠生

Studies on the floating seaweeds–II
Floating seaweeds found in Iki-Tusima region

Sokichi Segawa, Takeo Sawada, Masahiro Higaki and Tadao Yoshida

第1報においては津屋崎近海の流れ藻を対象とし，主として種類相や各種類の重量組成の周年変化について明らかにした（瀬川・沢田・檜垣・吉田1959）．すでに述べたように，沖合，とくに対馬暖流の主流に当ると思われる対馬方面の調査も沿岸のものと同様に必要であり，筆者らがこの研究に着手した時から流れ藻の資源的意義，起源などに関する解決をめざして沖合の調査を計画していた．

壱岐・対馬方面での調査としては，1957年7月から9月にかけて計4回の機会を得たが，その結果少なくともその当時の夏から秋のはじめ頃は予想に反して非常に流れ藻の量が少なかつたこと，および種類組成は同時期に津屋崎近海でみられるものと大差なかつたことなどがわかつたので報告する．なお従来海流調査のため各地で海流びんが投入されているので，流れ藻の移動と類似の関係にあると思われるこれらの結果について若干の考察を行いたい．

この調査は福岡県水産試験場の玄海丸，および佐賀県水産試験場の舞鶴丸で行つている月次定期海洋観測に便乗して行つたものである．便乗の便宜をいただいた両試験場長ならびに調査に協力いただいた乗組員の方々に謝意を表する．

方　　法

調査は1957年7月24日から26日までを佐賀水試の舞鶴丸で主として壱岐水道を（Fig. 2），7月2～10日，8月5～8日，9月11～13日の3回は福岡水試の玄海丸で対馬・北九州間（Figs. 1, 3, 4）を行つた．

採集は，流れ藻のかたまりが見つかると観測点以外でも適時停船し，流れ藻の量や状態によつて径1.5mの稚魚ネット，ボートフック，たも網などで行つた．材料は種類別の生重量，生殖器官の有無およびその成熟具合，鮮度などを肉眼的に調べたうえ，津屋崎近海で行つたと同様な種類別重量組成の百分比を求めた．

1) 九州大学農学部水産学教室業績，九州大学農学部附属水産実験所業績．

2) 日本水産学会昭和32年度秋期大会（1957年10月，函館）で発表した．

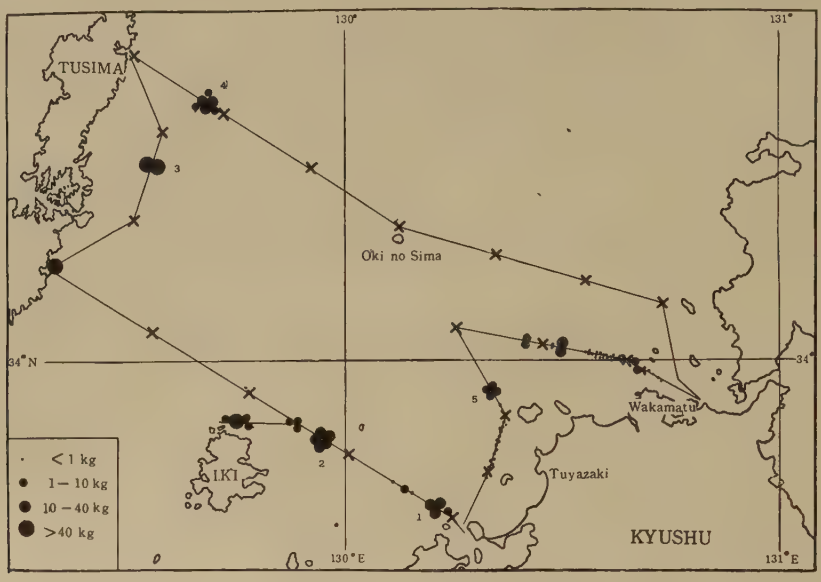


Fig. 1. "Genkai maru" routes of July 2–10, 1957. Numerals (1–5) correspond to those of Fig. 5.

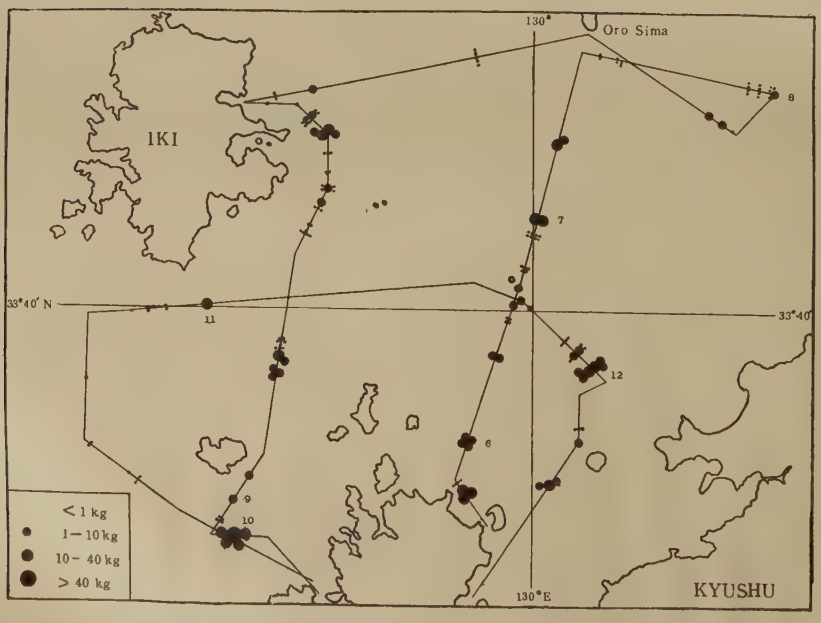


Fig. 2. "Maizuru maru" routes of July 24–26, 1957. Numerals (6–12) correspond to those of Fig. 5.

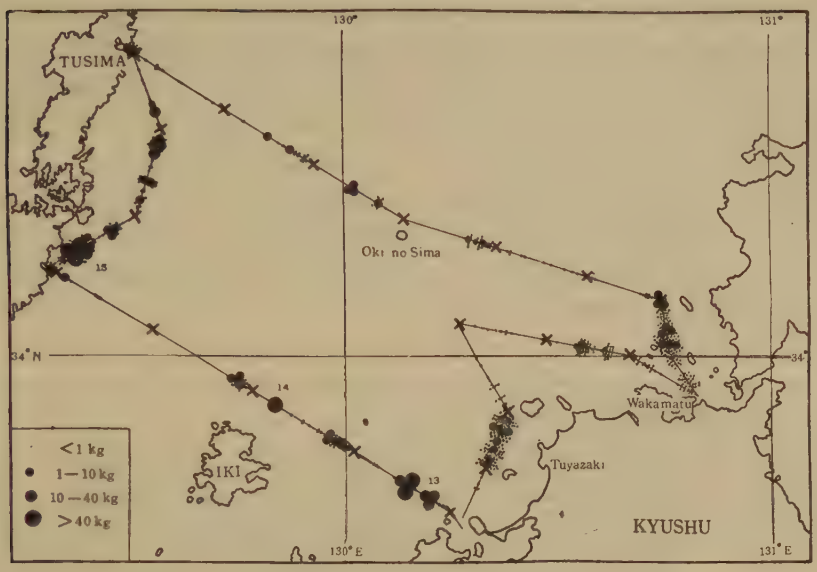


Fig. 3. "Genkai maru" routes of August 5–8, 1957.
Numerals (13–15) correspond to those of Fig. 5.

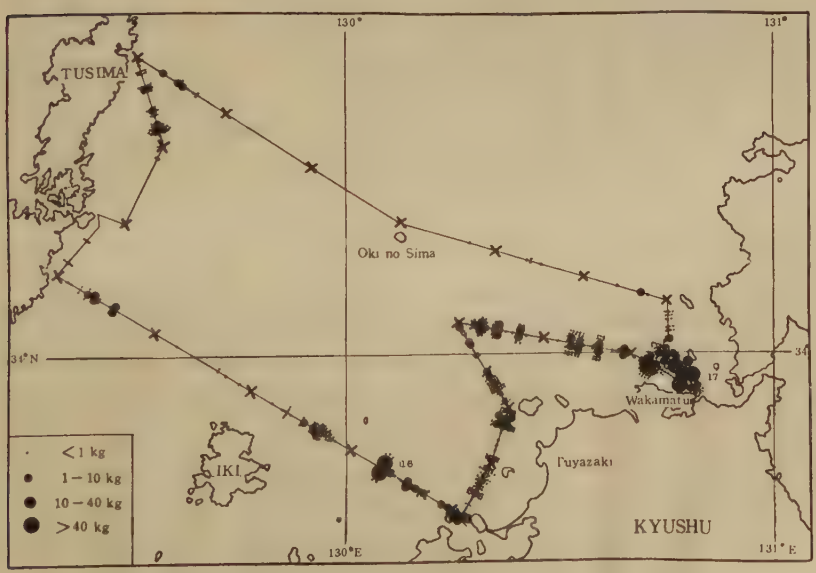


Fig. 4. "Genkai maru" routes of September 11–13, 1957.
Numerals (16–17) correspond to those of Fig. 5.

また分布状態を知るため，航路に沿つて目撃できる範囲のものを量によつて段階をつけ，時刻とともに記録した．すなわち，1kg 以下のもの（切れ端），1—10kg（小型），10～40 kg（中型），40kg 以上（大型）と大きさを区別しておき，帰つてからその地点を観測点の位置と時刻から算出した．大きさの段階はこの調査までに津屋崎で行つた流れ藻採集の際の経験から推定したものであつて，実測ではないから多少の誤差はあると思われるが，分布状態を明らかにする目的にとつては著しいさしつかえを生ずるものではない．

この量と時刻の記録は，天候のあまり悪くない時は船首で，非常に悪い時は操だ室で行つた．目撃できる範囲は天候・時刻によつてある程度左右され，早朝や夕刻などは反射光で非常にせまかつたが，ほぼ 15m くらいと思われる．しかし潮目の部分や大型ないし中型のものはかなり遠くまで見つけることができた．

結　　果

1. 流れ藻の種類別重量組成

毎回の調査で何回か採集を行つたところ，種類別重量組成について図のような結果を得た（Fig. 5）．これを津屋崎近海の材料で得た同時期のものと比較すると，ほとんど同様な傾向を示していることがわかる．すなわちこの時期，津屋崎附近に生育しているのと同じ種類が，流れ藻として津屋崎の近海にも対馬近海にも同様に多量みられることがわかる．

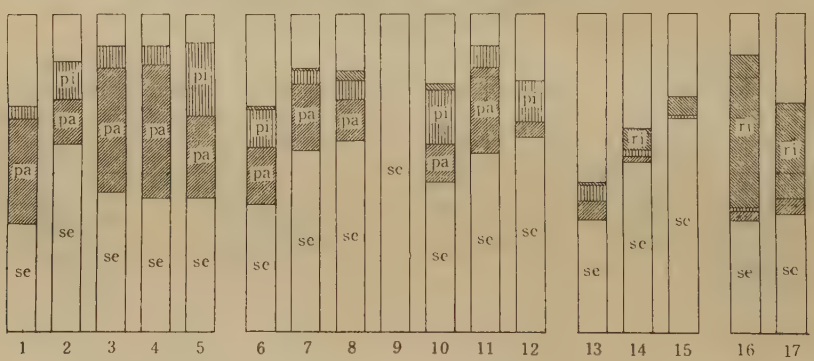


Fig. 5. The relative abundance by weight of major species of floating seaweeds. Numerals correspond to those of Figs. 1–4. se: *Sargassum serratifolium*; pa: *S. patens*; pi: *S. piluliferum*; ri: *S. ringgoldianum*.

しかし詳細にみれば，沖合の流れ藻中とくに壱岐水道のものにみられたのであるが，津屋崎附近ではすでにほとんどみられなくなつた早い時期のもの，ヒエモク，ジョロモク，アカモク，シダモクなどがみられたこと，一方津屋崎の流れ藻ではより後になつて出てきたオオバモクがみられたことなど相異点はあげられる．このことがその海域の特性を示すものであるかどうかはまだ調査回数が少ないため断定はできないが，主要種の種類別重量組成という点からみれば同様な傾向を示していることは図に示す通りである．

2. 流れ藻の分布状態

船の進行中に行つた流れ藻の量と時刻の記録から，流れ藻の分布に関して図のような結果が得られた（Figs. 1～4）．

この調査を行う以前には，対馬暖流に乗つて南方から北上して来つつある相当量の流れ藻を予想していたにもかかわらず，暖流の主流と考えられる対馬東水道には3回の調査を通じて非常に少なく，ただ沿岸部には壱岐・対馬の周辺，北部九州の沿岸をとわず比較的多くの量がみられた．

考　　察

流れ藻はそれ自身単に浮遊するのみであるから，その分布状態は主として海の流れに影響されるものと思われる．ここに従来行われたこの方面における海流びんの投入結果を参照し，今回得た結果および流れ藻の起源について若干の考察を行いたい．もちろん海流びんと流れ藻の流れ方はげんみつには全く同じではないかも知れないが，非常に類似しているものであることは想像できる．

種類別重量組成　沖合で採集した流れ藻の種類別の割合が，第1報で述べた津屋崎近海のものと非常によく似ていたこと，および量的に少ないものも含めての種類相がやはり両者ともほとんど同じであつたことは，次の2点によるものと思われる．すなわち対馬沿岸の海藻相と北部九州沿岸のそれがよく似ていること，および対馬方面から北部九州への漂着の可能性である．事実沖合からの漂着は従来行われた海流びんの結果（水産庁1958）によつても明らかである．

玄海灘（福岡—巌原間）での投入分についてその漂着結果を概括してみると，大半は長崎・佐賀・福岡・山口の近県に達しており，とくに北西の季節風が吹く冬期にはこの傾向が著しくて福岡近辺でその多くが拾得されている．夏期は対馬暖流の勢力が増大する時期であり，比較的遠距離にも達しているが，それでも暖流が劣勢と思われる年にはほとんど全部が北部九州沿岸に漂着した例もある．このことから壱岐・対馬方面の流れ藻が北部九州とくに福岡県沿岸に漂着することはじゆうぶん有り得ることと思われる．したがつて沖合をかたまりをなし，あるいはかたまりをなさずに個々のままで浮遊している流れ藻が，第1報で述べた津屋崎近海の潮目に集まることは考えられるわけである．しかもそれによつて津屋崎の流れ藻の種類相やその組成が変ることはなく，また流れ藻の起源にさかのぼることも困難である．

真正ホンダワラ亜属 Eusargassum の類の出現　対馬方面の流れ藻が北部九州に達する可能性については前述の通りであるが，壱岐・対馬方面にみられる流れ藻の起源としてはその近くのものと九州西部の沿岸から北上したものとが考えられる．そこで九州西部，主として天草—五島間での投入結果を参照してみたい．

この方面で投入された海流びんは4月中旬から6・7月にかけて，すなわち冬期の北西季節風が衰え南西卓越風の影響を受ける時期はほとんどが長崎県以北で拾得されている．しかしそれ以外の時期では南下する反流の影響を受けるらしく，太平洋岸側に達するものもあつて，この時期のものは津屋崎にみられる流れ藻の起源としては考慮しなくてもさしつかえないと思われる．したがつてこの方面の流れ藻は，主として夏期に津屋崎近海の流れ藻にあらわれる可能性を持つことになる．

天草・五島方面にはこの地方としての特性を持つたホンダワラ類はみられない．ただ

Eusargassum 亜属の類は鹿児島附近ほどではないにしてもいくらかの生育はみられる．津屋崎および沖合の流れ藻中に少量含まれているこの類は，津屋崎の沿岸ではまだ生育しているのを確かめていない．したがつてこの方面のものが北部九州に流入して来ることは一応考えられないこともない．しかし筆者らはもし津屋崎で潜水による潮間帯以深の調査を行うならば，あるいはある程度の量がみられるのではないかという予想を持つている．また壱岐・対馬においてもこの類が生育していないことを確かめたわけではない．これらの予想と今一つ，九州西岸の流れ藻が反流に乗つて南下する時期においてもなお津屋崎の流れ藻には *Eusargassum* の類がみられる事実は，天草方面から北部九州への漂流が可能性はあるとしても，実際の流れ藻の供給という点ではさほど大きい意味を持つていないのではないかと推測させる．

対馬東水道にみられる流れ藻には，もちろん東支那海から暖流の主流に乗つて北上するものも考えられるが，九州西岸の南下流からはずれるほどの沖合に流れ藻があるとすれば，それらは恐らく *Eusargassum* の類を多分に含んだ南方起源のものと思われる．しかし今までの夏～初秋の時期における壱岐・対馬方面の流れ藻にはそのようなものはみられなかつた．

流れ藻の起源にさかのぼるには東支那海方面での調査も必要となるが，同時に津屋崎近海で潮目に集まる機構や，そこに集まつたもののその後の経過を明らかにすることも望ましい．これらの点については別の機会に触れることにしたい．

要　　結

壱岐・対馬方面の沖合にみられる流れ藻を対象とし，1957年7月から9月までの間に行つた計4回の調査から次のような結果が得られた．

1. 沖合にみられる流れ藻の種類相は，津屋崎近海でみられた流れ藻のそれや，津屋崎の沿岸に生育している種類，打ち上げられる種類などとも非常によく似ていた．

2. 採集した流れ藻から種類別重量組成の百分比を求めると，それらは同時期に津屋崎の流れ藻から得た結果とほとんど同じであつた．

3. 夏～初秋の一時期の調査ではあるが，流れ藻の分布状態は暖流の主流と思われる対馬東水道附近には非常に少なく，沿岸附近には比較的多量にみられた．

4. 海流びんの投入結果を参照すると，津屋崎近海や対馬東水道附近の流れ藻の資源としては九州西南岸のものは可能性が乏しく思われる．

文　　献

水産庁，1958. 対馬暖流開発調査報告書，**1**：82–134.

瀬川宗吉・沢田武男・檜垣正浩・吉田忠生，1959. 流れ藻の海藻学的研究 – I. 津屋崎近海流れ藻の周年変化．九大農学芸誌，**17**(1)：83–89.

Summary

From July to September, 1957, the floating seaweeds around the Tusima-Higasi and the Iki Passages were surveyed four times on the facilities of the Fukuoka and the Saga Prefectural Fisheries Experimental Stations. The results are summarized as follows:

1) The species forming the floating seaweeds collected from this area appear almost similar to those of Tuyazaki region in the same season, as reported in the first part of this paper.

2) The relative abundance by weight of major species forming floating seaweeds of this area is also similar to the results obtained from the Tuyazaki materials in the same season (Fig. 5).

3) There was a small quantity of floating seaweeds in the Tusima Higasi Passage where the main stream of the Tusima Current runs through from the western Kyushu area to the Japan Sea. They were rather abundantly observed near the shore, probably along current-rips, as shown in Figs. 1–4.

4) From the results of the present surveys and the current investigations by the drift bottle method which were previously made by the Fukuoka and the Nagasaki Prefectural Fisheries Experimental Stations, there is considerable evidence, as mentioned in the first part of this paper, that the floating seaweeds in this area are not of origin of southern or western Kyushu area.

流れ藻の海藻学的研究—III

流れ藻形成機構に関する考察

瀬川宗吉・沢田武男・檜垣正浩・吉田忠生

Studies on the floating seaweeds-III

Some considerations on the formation of the floating seaweeds

Sokichi Segawa, Takeo Sawada, Masahiro Higaki, and Tadao Yoshida

九州大學農學部學藝雜誌, 第17巻 第3号, 別刷, 昭和34年12月20日

Reprinted from the Science Bulletion of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 17, no. 3, December 20, 1959

流れ藻の海藻学的研究—III[1)]

流れ藻形成機構に関する考察[2)]

瀬川宗吉・沢田武男・檜垣正浩・吉田忠生

Studies on the floating seaweeds-III

Some considerations on the formation of the floating seaweeds

Sokichi Segawa, Takeo Sawada, Masahiro Higaki, and Tadao Yoshida

流れ藻形成の過程には二つの段階を含んでいる．すなわち，岩礁地帯に発達したホンダワラ類の群落を構成している個体の一部分または全体が母体または基盤から何等かの原因によつて離れ，海面に浮ぶことと，そのような植物体が，沿岸水と外洋水との潮目などに集まつて大きい流れ藻の塊りを形成することである．ここでは，はじめに挙げた問題の一部をとりあげて考察を加えるが，流れ藻の種類相の季節的な変化の原因，およびホンダワラ類の藻体が群落から脱離する現象を見るのには二つの面から調査する必要がある．すなわち，流れ藻を採集してそれを構成するホンダワラ類の個体を調べて，どの部分からとれてきたかを知り，もとの群落の状態を推測することと，それらが属していたもとのホンダワラ類の群落を連続的に調査することであるが，後の調査はそうとう大がかりなものとなり，現在としては不可能であつたので，ここでは採集された流れ藻の調査の結果から考察する．

方　　法

調査した流れ藻は第1報に報告した種類相の変化を調べた材料の一部で，1957年3月から1958年4月までに採集したものである．採集した流れ藻は九州大学水産実験所に持ち帰つて，まず種類別にして，おのおのの個体または断片ごとに生殖器床の状態，基部の様子，重量などを記録した．生殖器床の状態は，生殖器床のないもの，未熟のもの，成熟したもの，および脱落によつて生殖器床の脱落したものに分けて記録した．また基部の状態は根をつけているもの，根の近くから切れたもの，主枝で切れたもの，それより上部で切れたものの4つに分けた．このようにして調査する際に生ずる誤差の原因となるものには，処理中に切れることがあるために実際よりも体の上部で切れたものの量が増加するということがある．これは船の上で流れ藻をとり扱う際に，ある程度は止むを得ないことであるが，できるだけ少なくするようにつとめた．実験所に持ち帰つて後はこのようなこと

1) 九州大学農学部水産学教室業績，および九州大学農学部附属水産実験所業績．
2) 日本水産学会昭和31年度九州支部大会（1957年11月，別府）で発表した．

はほとんどない．もう一つの誤差の原因は体の先端で切れた断片では種類の同定が困難なものがあるために，すこし少なめに数が出ることであるが，いずれもあまり大きくないと考えられる．この作業中，からみ合つた流れ藻を種類別にほぐすことに相当の時間を費す

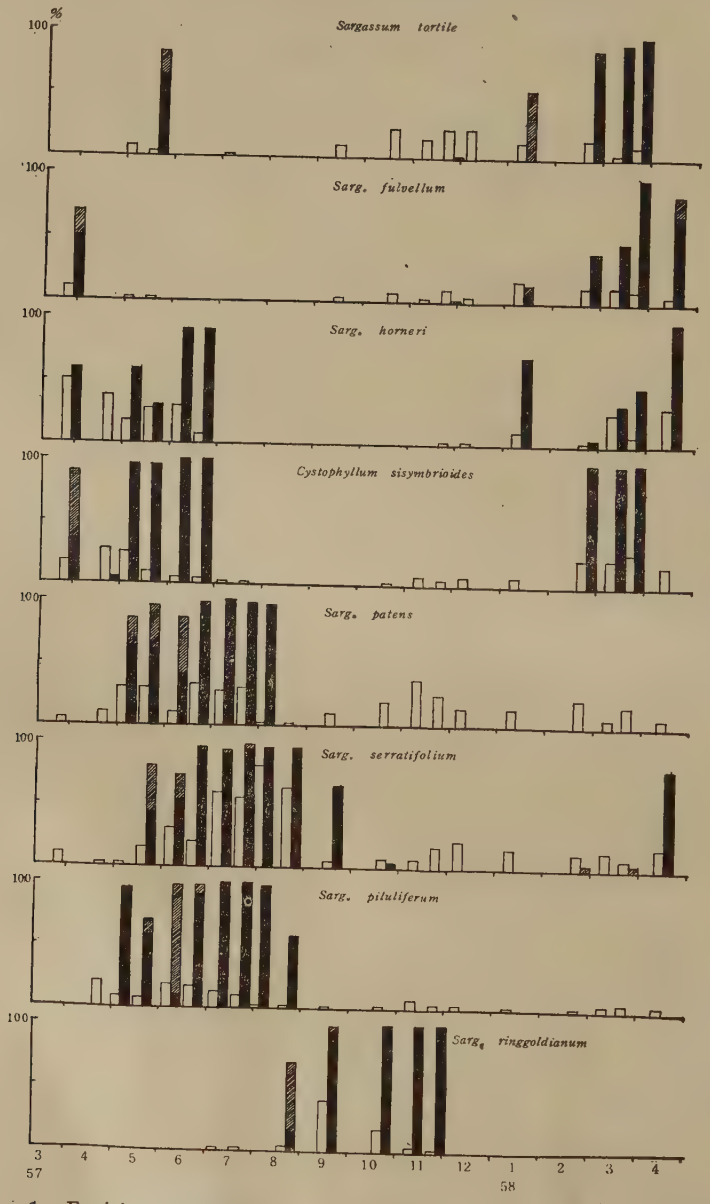


Fig. 1. Fruiting period of major species found as floating seaweeds. Histogram in dark indicates mature individuals; hatched histgram shows immature individuals; hollowed histogram denotes the relative abundance of the species by weight.

ので，1日で採集，調査を済ませるために，資料の量がある程度以下になつてくる．用いた資料の量は各回の調査で違っているが，だいたい15～30kg のものを処理した．

結果と考察

A）種類相の変化と成熟期との関係

第1報ですでに流れ藻に出現するホンダワラ類には著しい季節的消長があり，その種類の成熟期と関連があることに触れたが，これは流れ藻の形成にホンダワラ類の成熟が関係していることを示している．

上記のようにして得た採集物の記録から一つの種類について生殖器床のないもの，未熟のもの，および成熟したものと漏落したものの合計の三つに分けて各回ごとに集計し，その重量の割合を百分率であらわして Fig. 1 にまとめた．この図で黒い部分が成熟したもの，斜線の部分が未熟のものを示す．その左側の白い histogram はその種類がその時に占めていた重量の百分率組成を表わしている．資料の少ないものは除外した．こうすると，いつどの程度の割合のものが成熟していたかが分かるので，大部分のものが成熟している時期が一応その種類の成熟期と考えられる．流れ藻に出現するホンダワラ類のうち，重要なもの8種についてみると，いずれも一定の時期に成熟したものが出現しており，これがその種類の成熟期といえる．

ホンダワラ *Sargassum fulvellum* は8月終りから流れ藻として出現しはじめ，1～2月に最盛期になり，5月頃まで続いたが，その間，生殖器床が熟したものは1～4月に出現し，3月頃が成熟盛期であるといえる．

アカモク *Sargassum horneri* は流れ藻として11月頃から6月頃までに見られ，3～4月に最も多く出現したが，生殖器床をつけたものは1月から6月まで採集されている．この種では生殖器床をつけたものの出現率の変化が大きいので，いつが成熟盛期であるか決めがたい．

ジョロモク *Cystophyllum sisymbrioides* は 8，9 月には流れ藻にほとんど出現しなかつた．生殖器床をつけたものは2月から6月の間に見られた．

ヤツマタモク *Sargassum patens* はほとんど1年中流れ藻となつており，その間，夏に一時少なくなつて 5，6 月と 11 月頃の2度増加している．成熟期は5～8月で7～8月が盛期と考えられる．

ノコギリモク *Sargassum serratifolium* もほとんど1年を通じて採集された．7，8 月に最も多く，流れ藻の大部分を占めるようになる．また生殖器床をつけたものもこの時期に最も多く見られた．

マメタワラ *Sargassum piluliferum* もだいたい1年中見られるが，量的にはわりあい少ない．6～7月に多くなる．生殖器床を持つものは5～8月に採集され，7月には採集されたもの全部が成熟していた．

オオバモク *Sargassum ringgoldianum* は9月から 10 月にのみ多く，生殖器床をつけたものは8月から 11 月まで採集されたが，8月には未熟のものが相当多かつた．

ヨレモク *Sargassum tortile* は冬期に多く出現するが，成熟するのは3～5月の間である．

このように Fig. 1 に白い histogram として示した季節的変化の様子と比較してみると，流れ藻として出現する盛期と成熟期とはヤツマタモク，ノコギリモクのように初夏から夏にかけて成熟するものではだいたい一致している．しかし，他の種類では1カ月ぐらい遅くなつており，とくにヨレモクではそのずれが大きくなつている．

成熟期に達したものは，その個体が最も大きくなつている時期であり，この前後に種々な原因で流れ藻になり，他の時期より多くなることは容易に考えられる．まだ更に調査の要があるが，ホンダワラ類の成長状態と，そのときの海況，とくに波浪の強弱の関係が夏と冬で差があることが想像される．

また，この図によると各種類において成熟期が比較的長い．たとえばアカモクやノコギリモクでは6カ月にわたつて成熟体が採集されており，オオバモク・ホンダワラでも4カ月の間にわたつている．これはある限られた海域の一つの群落においてもこのように成熟期に幅があるのか，成熟期にずれのある広い海域のものが混合することによつているのか不明である．

B）切断個所と基部形態との関係

流れ藻になるホンダワラ類がその群落から脱落する状態を知るために，得られた記録を次のようにまとめた．一つの種について根のついているものと根の近くから切れているもの，およびそれより上部で切れたものの二つに分けて数をまとめ，各回の採集物について割合を百分率で表わす．これを Fig. 2 に示した．ここで黒い部分が基部からとれたものを表わしている．こうするとその割合の変異の巾は相当に大きいが，種類についての傾向は見ることができる．資料のすくないものはここでとりあつかうことができないので，そ

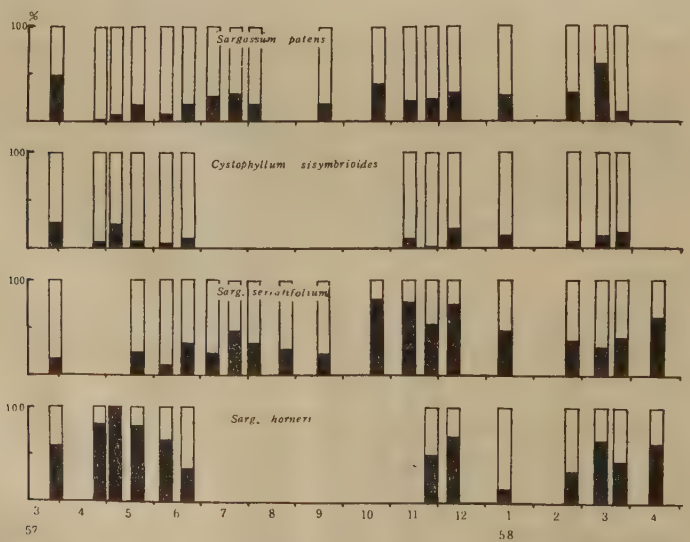


Fig. 2. Variation in proportion of individuals with basal part in four representative species. Histogram in dark shows the proportion by number of individuals with basal part.

の種類の基部の形態も考慮してアカモク，ジョロモク，ヤツマタモク，ノコギリモクの4種を選んで考察する．

ヤツマタモクはある程度の変化はあるが，1年を通じて約 24％ のものが根または根の近くから切れたものであり，ジョロモクに次いで少ない．

ジョロモクは基部から脱落したものが年間の平均約 13％ でとくに少ない．

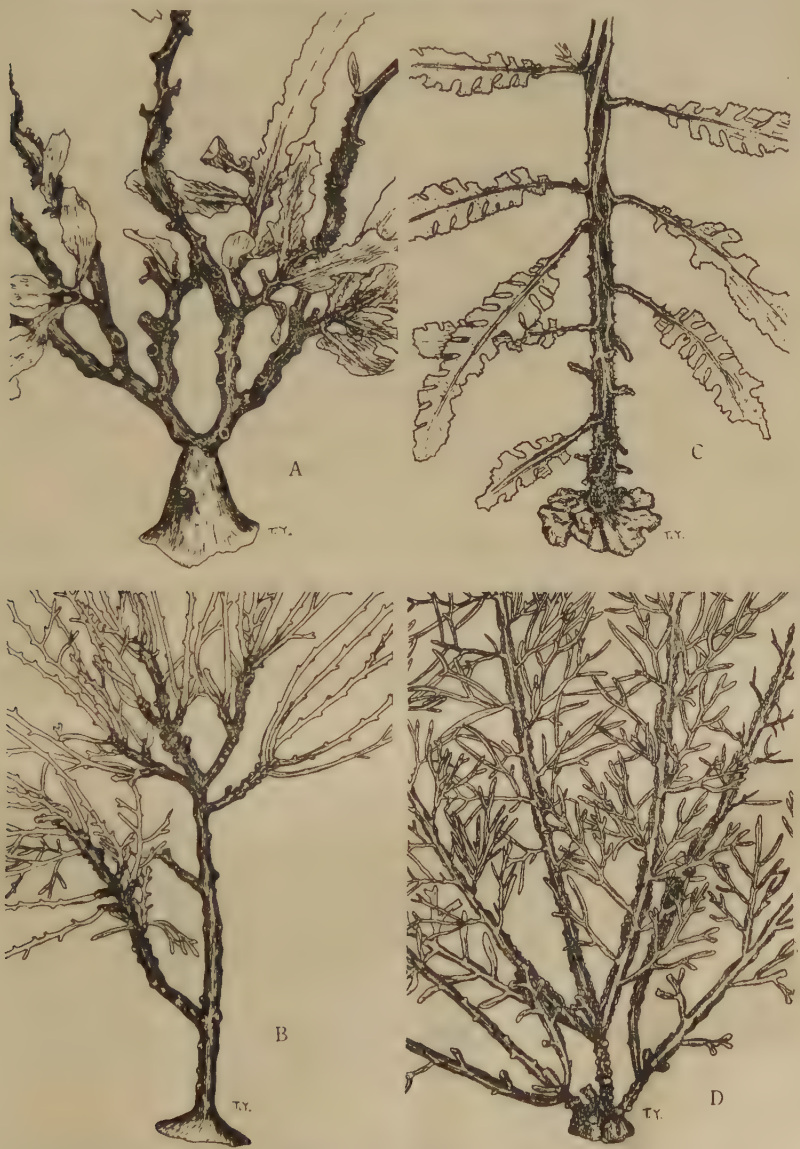


Fig. 3. Basal part of four representative species. A. *Sargassum serratifolium*, B. *Cystophyllum sisymbrioides*, C. *Sargassum horneri*, D. *Sargassum patens*.

ノコギリモクは秋に基部から離れたものが多くなつているようであるが，平均してみると約 40％ をしめている．

アカモクはだいたい1年中基部から脱落したものが多く，約 60％ を占めている．

このように種類によつて群落から離れるときの状態に差があることが明らかになつたが，1年生のアカモクに基部から脱落するものが多いことは容易に推察できる．またアカモクの基部（Fig. 3, C）は仮盤状根からふつう1本の茎が出ており，これはあまり分岐していないという特徴がある．

次にアカモクを除いた上記3種についてみると，これらはいずれも多年生であるが，その基部の形態が相当に違つている．すなわちジョロモク（Fig. 3, B）では盤状根から長さ 10cm 以上にもなる扁圧した茎が出ており，その茎の両側から細い主枝が多数出ている．ヤツマタモク（Fig. 3, D）は平たい盤状の根から短かい茎を生じ，その頂部に扁平な主枝を数本つけている．またノコギリモクでは円錐状根から円柱状の茎が出て，それはわずか枝分かれして扁平な主枝になつている（Fig. 3, A）．このような形態の差に基いて体の各部の割合，重量などの違いにより，上のような数字の差がでてくると考えられる．

オオバモクはノコギリモクと類似した基部形態をもつており，同様な傾向を示すと思われ，ヤツマタモクとマメタワラはひとまとめにして考えることができ，ヒエモクはジョロモクと同じグループに入れることができる．またアカモクとホンダワラはいずれも1年生であり，群落から脱離する状態も似ていると考えられる．

要　　約

1957年 3月から1958年 4月まで福岡県津屋崎近海で採集した流れ藻について成熟期と，その個体の基部の状態をしらべた．

1. 流れ藻に出現した主要な種の成熟盛期は，この海域では次のようになる（Fig. 1）．

ホンダワラ	3 月
アカモク	3～4 月
ヨレモク	3～4 月
ジョロモク	3～5 月
マメタワラ	7 月
ヤツマタモク	7～8 月
ノコギリモク	7～8 月
オオバモク	9～10月

2. 流れ藻として出現する盛期と成熟期とは，夏に成熟するもの（例，ヤツマタモク，マメタワラ，ノコギリモク）ではよく一致し，春に成熟するもの（例，アカモク，ヨレモク）では少しずれが大きくなる（Fig. 1）．

3. 1年生ホンダワラ類は基部からとれたものが多く，多年生のものではノコギリモク，ヤツマタモク，ジョロモクの順で基部からとれたものが少なくなる．これはその基部の形態と関連している（Figs. 2, 3）．

4. 流れ藻の形成はいつぱんに各々の種が最も大きくなつた時に多く起るが，冬から春にかけて成熟期よりも前に多く流れ藻になるのは，この時期の天候にも関係があると考えられる．

Summary

Using the materials of Tuyazaki region reported in the first part of the present study, the fruiting period and the conditions of the basal portion of individuals in each species were examined into details with special reference to the formation of floating seaweeds.

(1) The fertile individuals of major species of floating seaweeds occur abundantly in the following months (Fig. 1):

Sargassum fulvellum	March
S. horneri	March — April
S. tortile	March — May
Cystophyllum sisymbrioides	March — May
Sargassum piluliferum	July
S. patens	July — August
S. serratifolium	July — August
S. ringgoldianum	September — October

(2) In the species of summer fruiting period such as *S. patens*, *S. piluliferum*, *S. serratifolium*, etc., the rise in relative abundance of a certain species occurring as floating seaweeds is nearly coincident with the increase in proportion of mature individuals in the same species. Of the species which mature in spring such as *S. fulvellum*, *S. tortile*, etc., on the other hand, the period of maturity shows some delay from the rise in quantities of the same species (Fig. 1).

(3) Annual *Sargassums* have a tendency to detach at their basal holdfast from the substrata. While in the perennial forms the investigation into the proportion of the individuals with their basal part shows the decreasing order as follows: *S. serratifolium*→*S. patens*→*C. sisymbrioides*. This difference seems to be related to the shape of their basal parts (Figs. 2, 3).

(4) It is considered that the formation of floating fucaceous algae occurs mainly at the time of the maximum growth of each species, and that the difference between the rise in relative abundance of a species in winter and its spring fruiting period may partly be attributed to the weather conditions in these months.

BIOLOGY OF THE JAPANESE ANCHOVY, *Engraulis japonica* (HOUTTUYN), IN THE NANKAI REGION. I

By

Kōji Takeshita and Hiroaki Aikawa

Reprinted from
Records of Oceanographic Works in Japan
Special Number 3
October 1959

Records of Oceanographic Works
in Japan. (Special Number 3)
October 1959

BIOLOGY OF THE JAPANESE ANCHOVY, *Engraulis japonica* (HOUTTUYN), IN THE NANKAI REGION. I

By
Kōji Takeshita and Hiroaki Aikawa

Among the Japanese anchovy there are seasonally two groups. *Aikawa* (1950, '54), *Yokota* et *Furukawa* (1952), *Asami* et *Hanaoka* (1957) and many other authors stated that these two groups are different from each other in the vertebral number and that these two are considered as different races respectively. Mingling, probably, with each other during development and aslo in fishing, there arise many errors in distinguishing the races based on the vertebral number throughout the development from brood to adult. Hence, some characters other than the vertebral number must be employed for racial analysis.

Present authors tried to analyze the race based on the size of marks formed

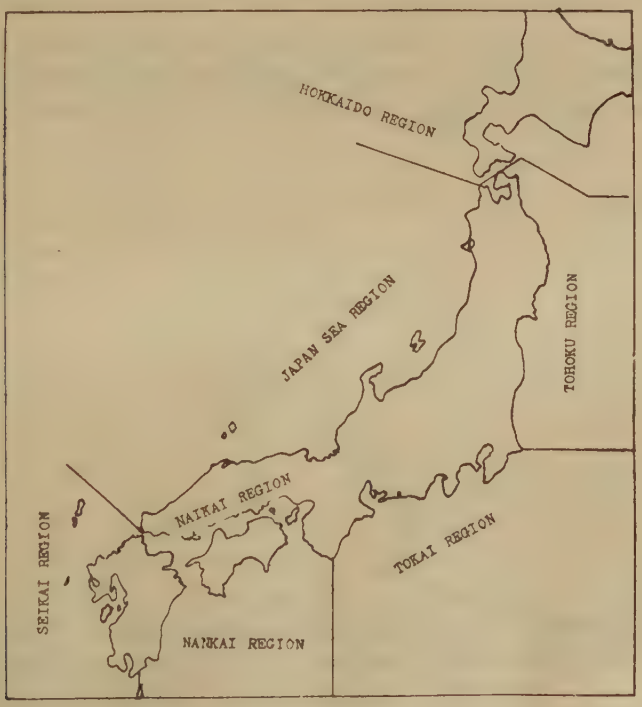


Fig. 1. Water-regions around Japan.

on the scale, and verified its validity from comparing the results with those based on the vertebral number.

The specimens examined amounted to 1098 fishes among 2000 sampled from the catches throughout the regions around Japan, mainly in the Nankai region since 1953. In addition, some data on the vertebral number are referred to the reports issued from several regional fisheries institutes.

1. The vertebral number

The simple average of vertebral number, as a racial character, cannot indicate the variation type itself which is usefully applied to discriminate the race in the present report.

The vertebral number of the Japanese anchovy varies from 42 to 47 pieces, mostly between 44 and 46, having a mode in 45, not only in almost all samples but as a whole. Here, taking 45 pieces as a standard, percentage frequencies of the individuals provided with the pieces more than 45 and of those with pieces less than 45 are calculated in each sample. And, by testing with the confidence limit (Pr. 90%), there are found three groups: (1) number of individuals with pieces more than 45 are significantly more dominant than those with less than 45, that is, *V*-group; (2) both are not significantly different from each other and (3) the former is smaller than the latter is, those in last two cases are called here *v*-group together, as the case (3) is found only in 10 samples among 533.

There is found only one peak in frequency distribution of the average vertebral number, so far concerning the size group under 50 mm. in body length in the Nankai region, by using the data from Report B issued from Nankai

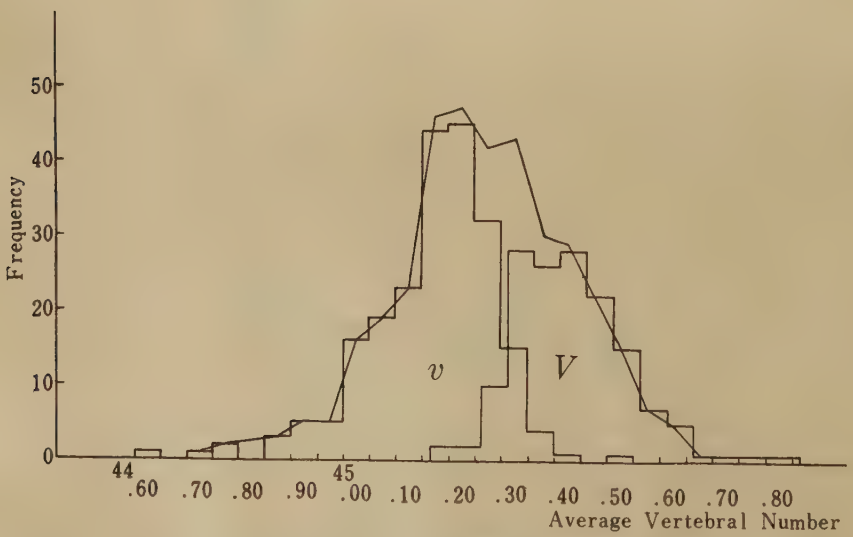


Fig. 2. Frequency distribution of average vertebral number in *v*- and *V*-groups.

Regional Fisheries Research Laboratory, about the sample more than 20 individuals in sample size. This unimodal group comprises *V*- and *v*-groups, each of which is bordered on the average vertebral number of 45.25 from each other and has a mode respectively (Fig. 2).

From tracing the monthly change in the relative frequencies of *V*- and also *v*-groups, it is found that while *V*-group is dominating in the former half of year, especially in March and April, *v*-group is dominant in the latter half (Fig. 3a). Then, *V*-group is originated from spring brood group, while *v*-group

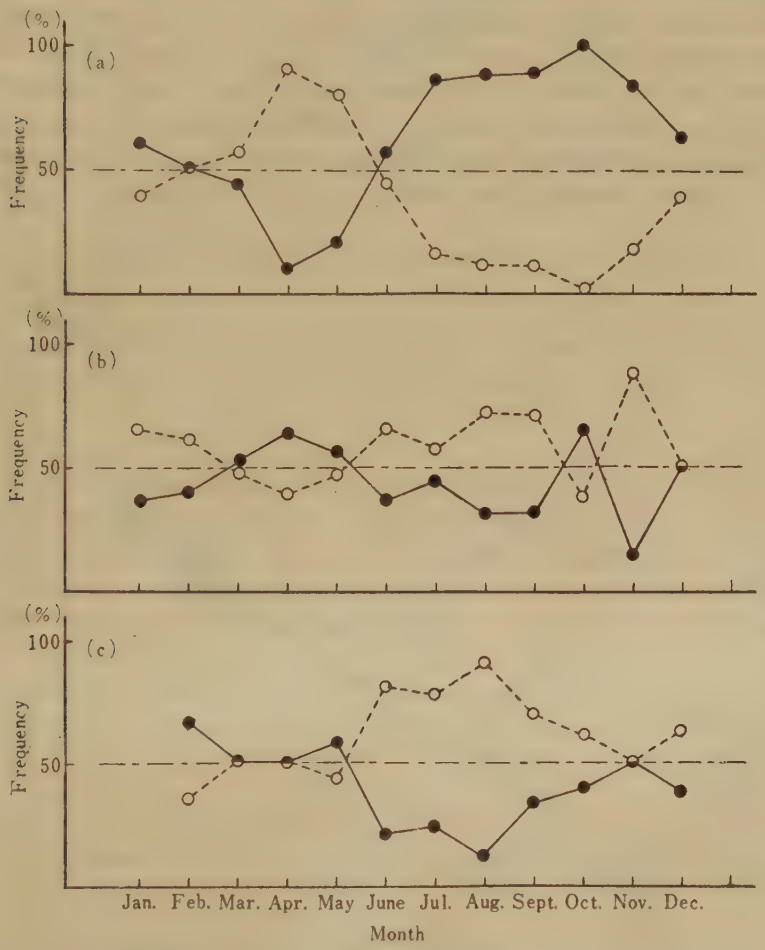


Fig. 3. Monthly change of relative frequency of *v*- and *V*-groups.
a: Small sized (white-bait) group, under 50 mm. in body length.
b: Medium sized group, 50 mm.—100 mm. in body length.
c: Large sized group, over 100 mm. in body length.

Note: ● ..... *v*-group
○ ..... *V*-group

from autumn one. In both medium and large size groups, the seasonal alternation of *V*- and *v*-group is inapparent (Figs. 3b and 3c), probably because these two groups mingle with each other either during the development or during fishing and even among the catch.

2. Marks formed on scale

Although no marks are distinctly formed both on otolith and on centrum, these are always found on scale. Among the scales taken throughout the lateral side of the same fish, there are found three types: (1) scales of bilateral symmetry is A-type, being provided with marks formed well; (2) asymmetrical scale, though resembling much A-type scale in general appearence, is B-type where marks are less distinctly formed and (3) scale of irregular form is C-type where marks are nearly always inrecognizable and any definite measuring axis cannot be chosen adequately. Hereafter, A-type scales only are used for reading. A-type scales, after taken off from fish, are soaked in 3% KOH solution for about 15 hours for cleaning, then washed well with water and put between two

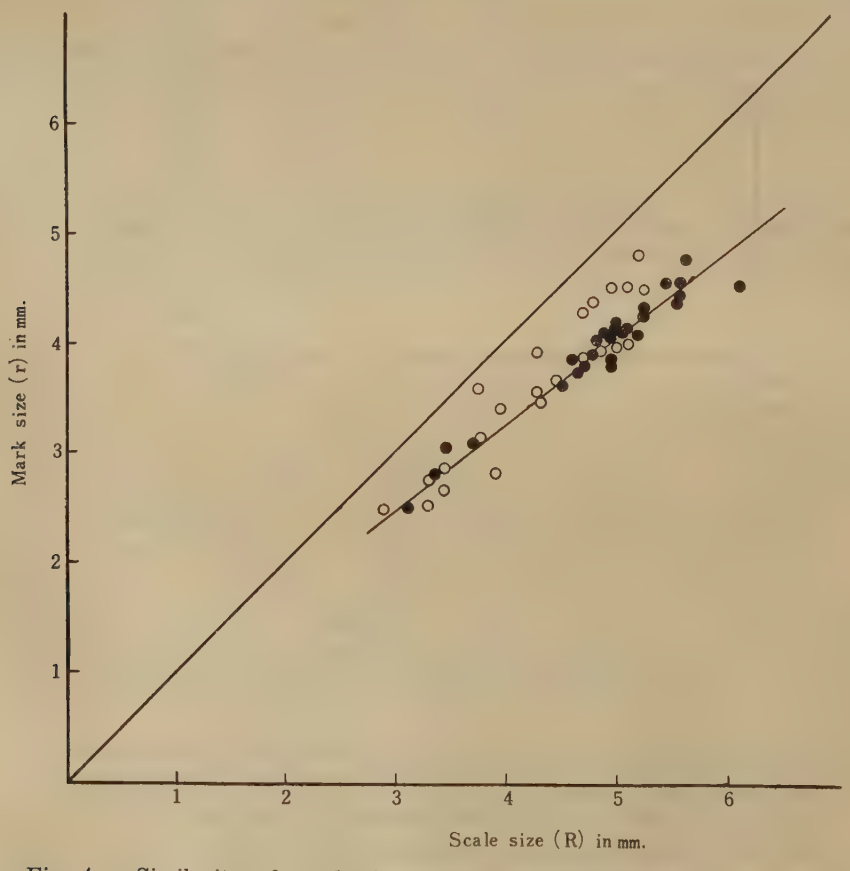


Fig. 4a. Similarity of mark size within the same fish (S_1).
Note: ● .... A-type scale, ○ .... B-type scale

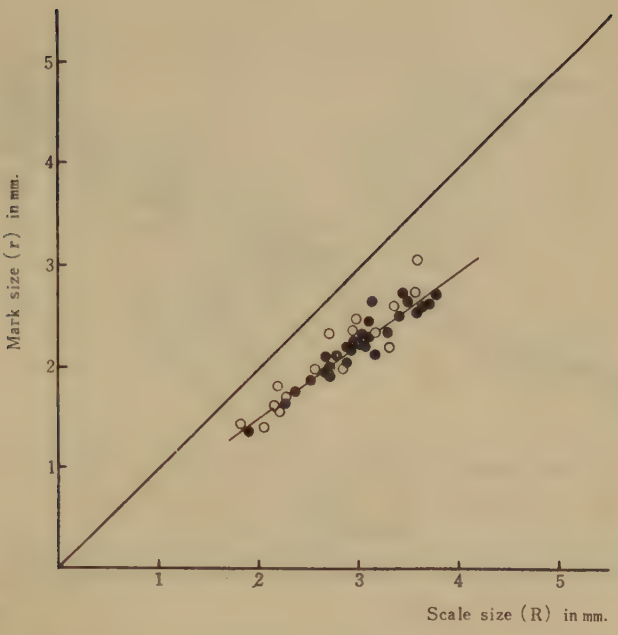


Fig. 4b. Similarity of mark size within the same fish (s_1).
Note: ● .... A-type scale, ○ .... B-type scale

slide glasses. The scales prepared in this way are enlarged by twenty times by the projector made by the Nippon Kogaku Co. and measured.

2.1 Type of the mark: Scales of the Japanese anchovy are of inflection-type and marks are defined as cutting-over made of ridges (Menon, 1950; Allen et al, 1956), (Plate. I). Scale size, R in mm., and mark size, r in mm., are measured along the antero-lateral axis (Plates. I and II).

2.2 Similarity of mark size: The relationship of scale size with mark size is approximately expressed by a straight line (Figs. 4a and 4b), indicating that there exists similarity of mark size. Here, any measured mark size, r, can be standardized by such a procedure as $\hat{r}=r\cdot\frac{\hat{R}}{R}$, where $\hat{r}$ is standardized mark size and $\hat{R}$ is known from relationship between body length, L, and scale size, R, $\hat{R}=0.0433\ L-1.16$ (Fig. 5).
Hereafter, our discussion is made based on the standardized mark size.

2.3 Correspondency of mark size: The frequency distribution curve of the innermost mark (Fig. 6) is composed of two modal groups, one of these modes is situated in the range between 2.25 mm. and 2.75 mm. ($s_1$mark), another is in that between 3.75 mm. and 4.00 mm. (S_1-mark) respectively. Similarly the frequency distribution of the marks succeeding the innermost one shows also two modes, one between 3.75 mm. and 4.25 mm. (s_2-mark) and another between

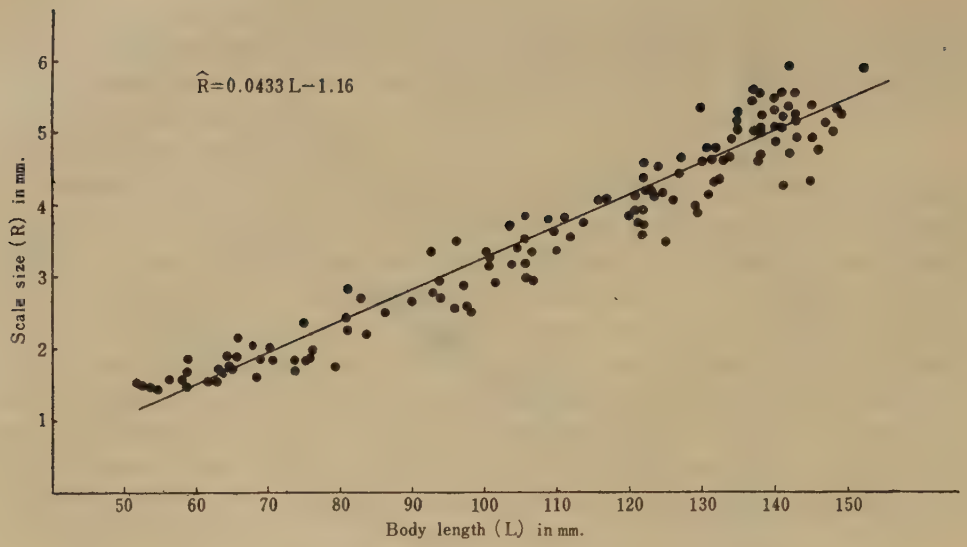


Fig. 5. Relationship between body length and scale size.

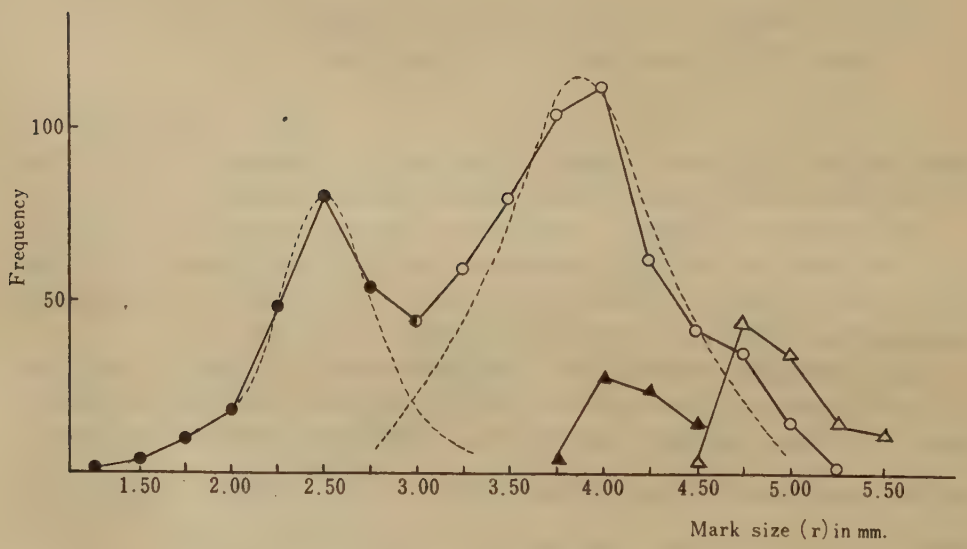


Fig. 6. Frequency distribution of mark size.
Note: ● .... s_1-group, ▲ .... S_1-group
○ .... s_2-group, △ .... S_2-group

4.75 mm. and 5.00 mm. (S_2-mark) (Fig. 6). Two-mark scale is either of $s_1.s_2$- or of $S_1.S_2$-type, but neither of $s_1.S_2$- nor of $S_1.s_2$-type (Fig. 7). The relationship of body length with mark size, though approximately, is expressed by a straight line with the variation within the confidence interval (Pr. 90%), indicating

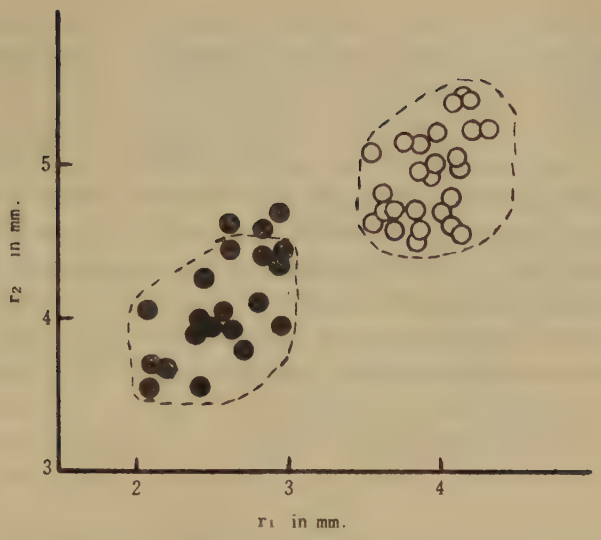


Fig. 7. Relationship between the innermost mark size (r_1) and the succeeding one (r_2).

Note: ● .... $s_1.s_2$-group, ○ .... $S_1.S_2$-group

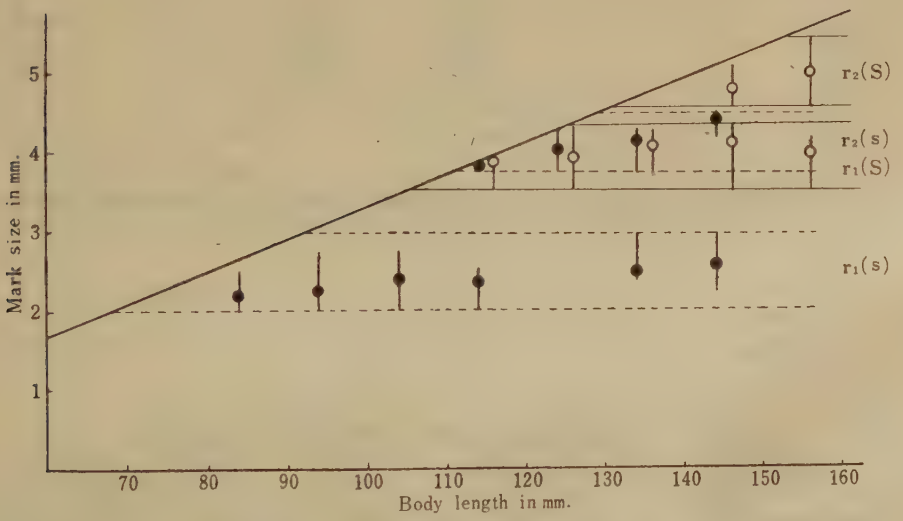


Fig. 8. Correspondency of mark size in each size class.

Note: ● .... s-group, ○ .... S-group

that correspondency is recognized in mark size throughout a wide range of body length and also that mark size remains nearly constant (Fig. 8).

By substituting the maximum and minimum estimates of the mark size, intermediate body length in mm. with its deviation is computed as below.

(unit: mm.)

$r_1(s)$	$r_2(s)$	$l_1(s)$	$l_2(s)$
2.00～2.95	3.75～4.50	69.5～93.5	112.1～129.1
$r_1(S)$	$r_2(S)$	$l_1(S)$	$l_2(S)$
3.50～4.34	4.55～5.45	106.4～125.9	130.5～151.1

2.4 Time when mark is formed: The relative frequency of individuals with scales which have first mark along its margine changes monthly in both *s*- and *S*-groups (Fig. 9). This frequency attains maximum in December and January, showing that the marks (s_1 and S_1) are formed during these months. The second mark (s_2 and S_2) must be similarly formed in these same months, even though based on insufficient data. In other words, all the marks are formed in winter.

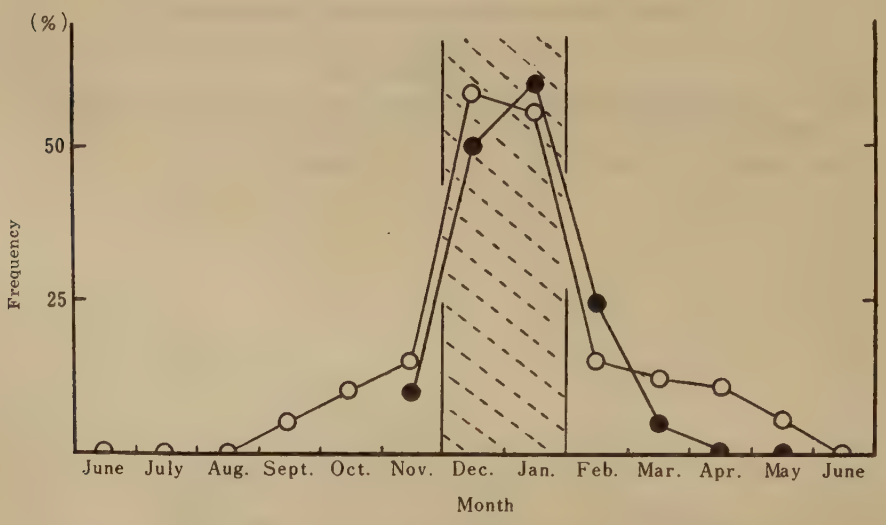


Fig. 9. Monthly change in relative frequency of individuals with scale which has the first mark along its margine.
Note: ● .... s_1-group, ○ .... S_1-group

Table 1. Probability of mark formation in each fish.

Group	S_1					S_2				
Specimen number	I	II	III	IV	mean	I	II	III	IV	mean
Number of scale read	20	20	20	18	20	20	20	19	19	20
Number of scale with mark	20	17	16	16	17	19	18	19	15	18
Pr.	1	.85	.80	.89	.85	.95	.90	1	.79	.90

2.5 The probability of mark formation: The probability of mark-formation is generally high in each fish (Table 1), and also in group, being 0.84 (92 fishes among 110) between 70 mm. and 130 mm. in body length in March when the first mark must be present on scale.

3. Discrimination of race based on the first mark size

As stated before, two groups are distinguished from each other based on the types of first mark (s_1 and S_1). The variation type in vertebral number, so far as S_1-group is concerned, is generally of V-type (percentage frequency of individuals with vertebral number more than 45 is significantly higher than that with less than 45). On the other hand, s_1-group is always of v-type (percentage frequency of individuals with vertebral number less than 45 is significantly higher than that more than 45 or the difference between both rather insignificant) (Table 2). Whereas, S-group is considered as originated from spring brood group and s-group from autumn one.

Table 2. Variation-types of vertebral number with the different mark-types.

Region (Locality)	*S*-group						*s*-group					
	Variation					Type (average)	Variation					Type (average)
	43	44	45	46	47		43	44	45	46	47	
Nankai		12	58	**29**		V (45.17)	1	7	13	11		v (45.09)
Seikai	1	2	18	**13**		V (45.27)		**9**	16	2		v (44.74)
Naikai							2	**21**	37	8		v (44.78)
Japan Sea (Kyoto)		2	15	**9**	1	V (45.33)		2	4	3	1	.....
Tokai		1	10	**10**	3	V (45.62)	2	8	10	3		v (44.62)
Tohoku (Aomori)		4	15	**12**	1	V (45.31)		9	9	8	1	v (45.04)
Hokkaido		6	30	**19**	1	V (45.27)			5			.....

Note: Gothic letters indicate the significant dominacy to characterize the group.

Aikawa (1950, '54), *Yokota* et *Furukawa* (1952), *Asami* et *Hanaoka* (1957), after discriminating races based on the vertebral number, traced the growth course and attained nearly similar estimates. The body length at the end of year given by these authors just coincides intermediate body length, when the mark is formed, that is, $l_1(s)$ from $r_1(s)$, $l_2(s)$ from $r_2(s)$, $l_1(S)$ from $r_1(S)$ and $l_2(S)$ from $r_2(S)$ respectively. Large sized individuals with three marks or more (2.5 or nearly 3 years or older) are never found among the catch from the coastal waters.

Lastly it must be noted here that the intermediate body length $l_1(s)$ is smallest and that while $l_1(S)<l_2(s)<l_2(S)$, all the differences between them are

very slight. The autumn brood will grow more rapidly than the spring brood after the former passes its first winter.

4. Analysis with the fallen scales

As it is difficult to take scales directly from fish of this species, because they fall easily during fishing, and after landing the catch bulk of scales is always left in the hold of boat, it is rather advantageous to use the fallen scales for the age-determination and racial analysis.

From the catch off Fukuoka in April 1957, scales of bucketful were sampled from four different part in the hold of boat, after mixed altogether, about 1300 scales are taken and among them A-type scales only are used for measurement, as they are least variable in several respects.

Unimodal frequency distribution of scale size well coincides with that of body length and there is no significant difference between them (Fig. 10). The

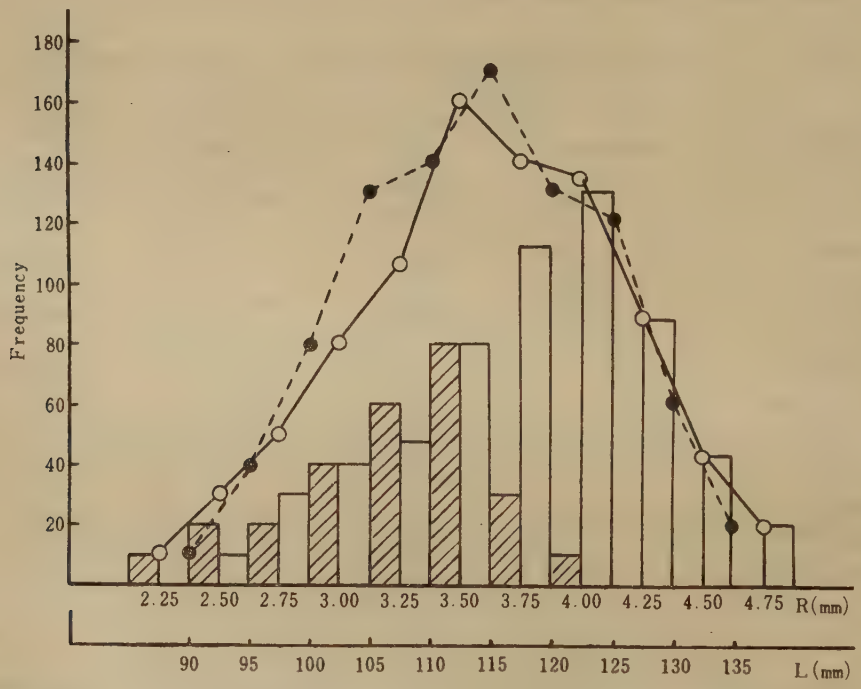


Fig. 10. Frequency distribution curve of the body length from the catch and of size of the fallen scale left after landing.

Note: ● .... Frequency of body length, L.
○ .... Frequency of scale size, R.
Histograms .... Scales with s_1-mark (shaded), and with S_1-mark (open).

relationship between scale size, R, and mark size, r, though there is no scales with two marks, is expressed by two straight lines (Fig. 11). Accordingly among this material there must be two groups such as S_1 and s_1 both mingling with each

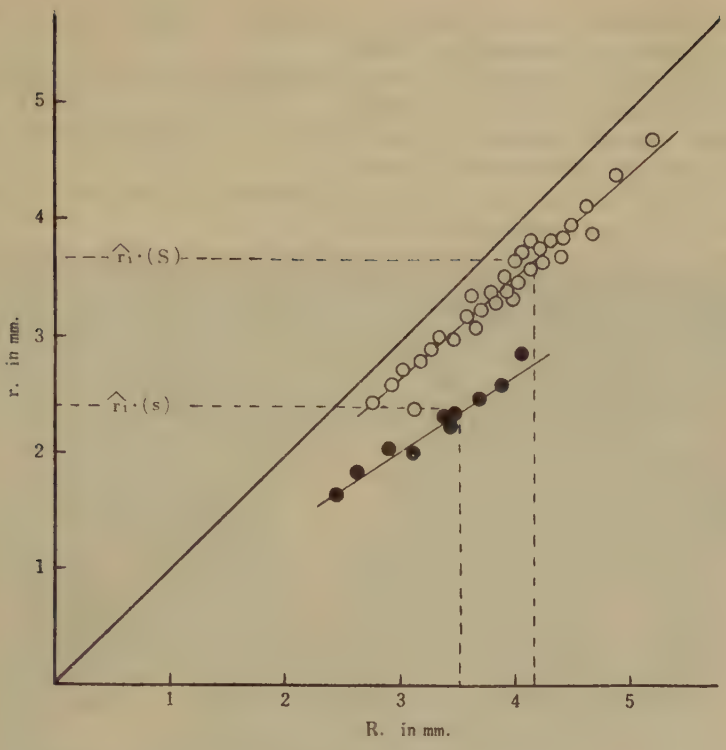


Fig. 11. Similarity of mark size in the fallen scales.
Note: ● .... s_1-group, ○ .... S_1-group

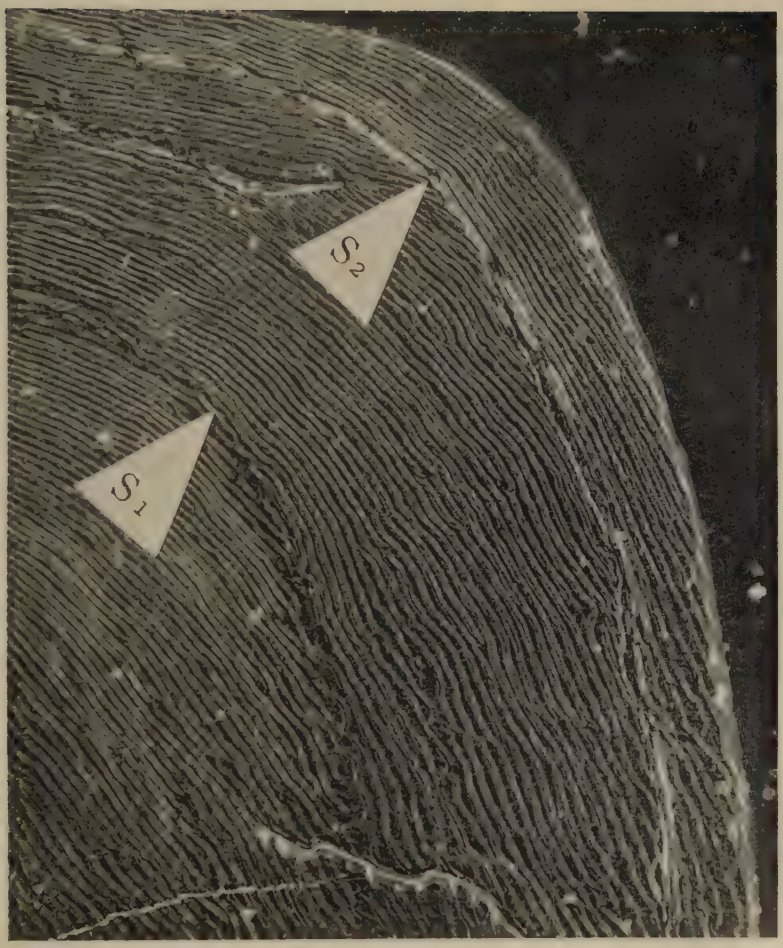
other. Based on the ratio of S_1 or s_1, in each size class, the total group can be divided into those of S_1 and s_1 respectively. Taking these modal values as standard mark size, r_1, they are 2.40 mm. for s_1-group and 3.68 mm. for S_1-group. These estimates equal those obtained from scales taken directly from fish. By the same way, two-mark group can be divided, when the composition of scales with different type of mark is known, into two different groups such as $s_1.s_2$- and $S_1.S_2$-groups.

Lastly, based on the scale composition, any group can be qualitatively discriminated either as a race-complex or as a single race and also analyzed quantitatively into different races whenever it is composed of both spring and autumn broods.

Literature

(1) Aikawa, H. et al: Journ. Fac. Agr., Kyushu univ. 9 (3) (1950).
(2) Menon, M. D.: Journ. Cons. Perm. Int. Expolor. Mer, 16 (3) (1950)
(3) Maekawa, K et Yatsunagi, T.: Jap. Soc. Sci. Fish., Bull., 16 (12). (1951).
(4) Yokota, T. et Furukawa, I.: Jap. Soc. Sci. Fish., Bull., 17 (8,9). (1952).
(5) Aikawa, H.: Biology of Japanese anchovy, Engraulis japonica (Houttuyn). (1954).

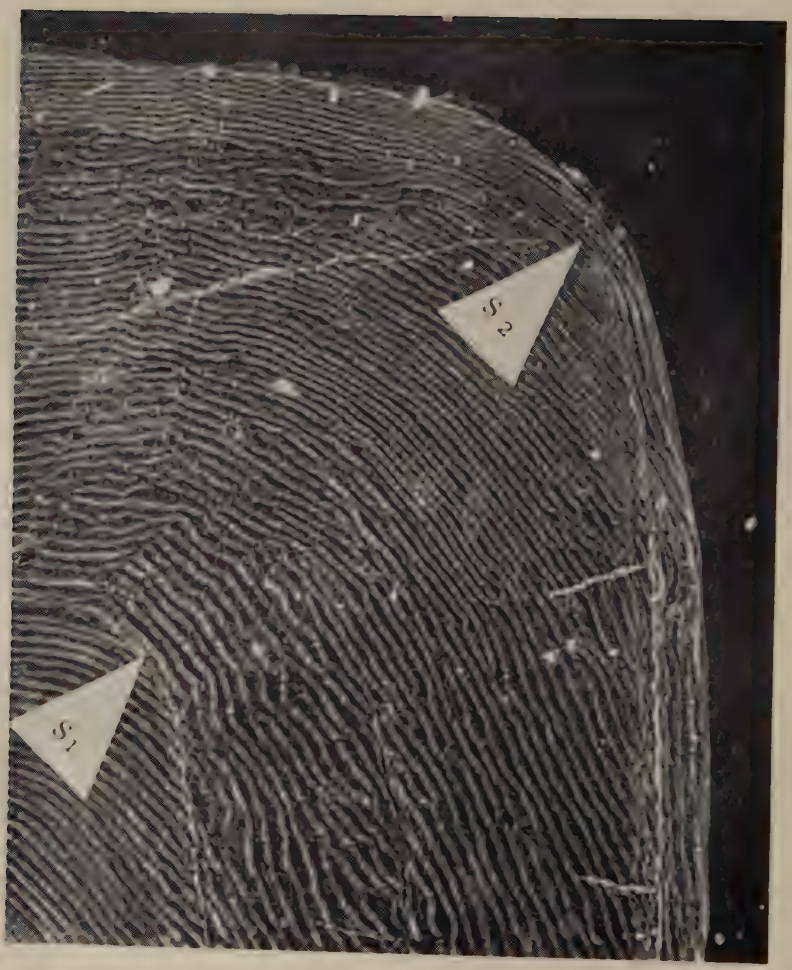
(6) Tokai Regional Fisheries Research Laboratory: Prog. Rept. of Cooperative Iwashi Resources Investigation. (1955).
(7) Seikai Regional Fisheries Research Laboratory: Prog. Rept. of Cooperative Iwashi Resources Investigation. (1955).
(8) Nankai Reginal Fisheries Research Laboratory: Prog. Rept. of Cooperative Iwashi Resources Investigation. (1956).
(9) Japan Sea Regional Fisheries Research Laboratory: Prog. Rept. of Cooperative Iwashi Resources Investigation. (1957).
(10) Asami, T. et Hanaoka, M.: Bull. Nankai Reg. Fish. Res. Lab. (1957).
(11) Kondo, K: Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 17. (1957).
(12) Hayashi, S. et Kondo, K.: Bull. Tokai Reg. Fish. Lab. (1957).



× 50

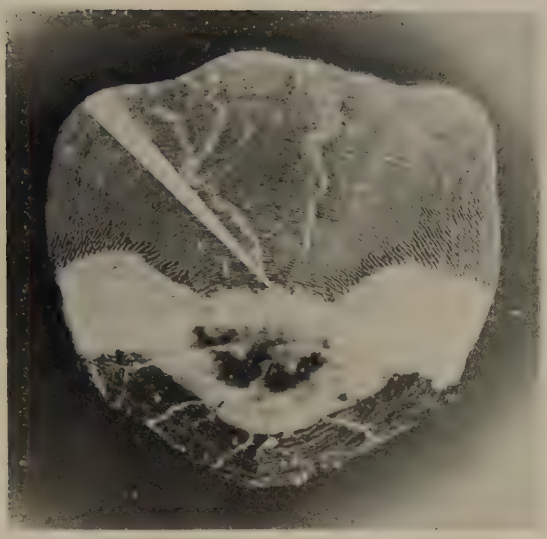
Plate I.

Antero-lateral side of marks formed on scale (S-group).

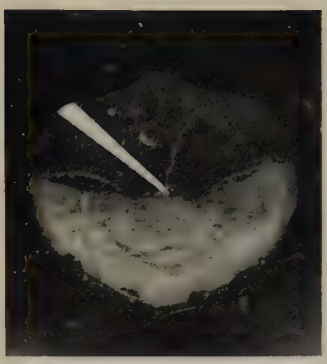


× 50

Plate II.
Antero-lateral side of marks formed on scale (*s*-group).

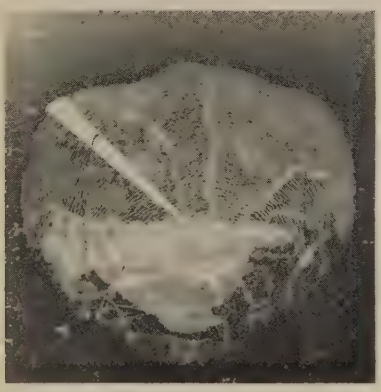


(a) × 9



(b) × 9

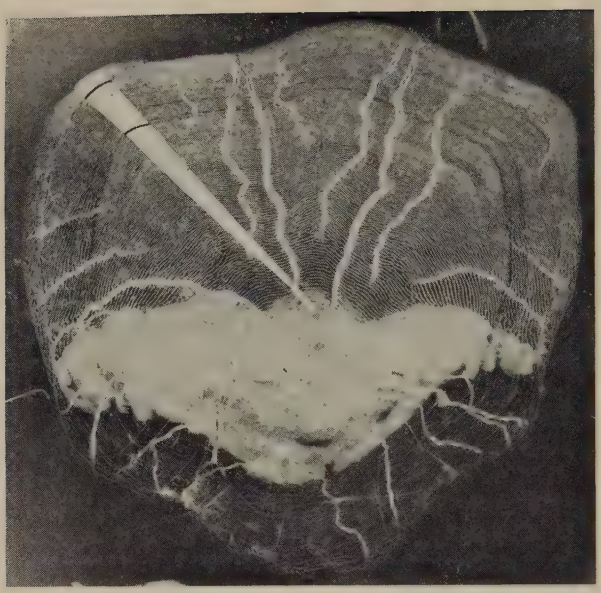
(c) × 8



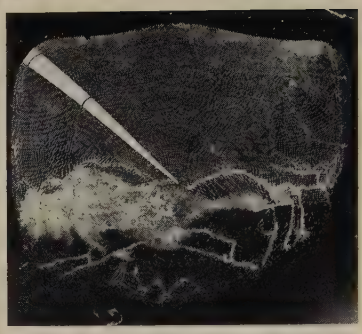
(d) × 8

Plate III.

(a) Scale from fish 76 mm., caught in July. No mark presents.
(b) Scale from fish 61 mm., caught in December. No mark presents.
(c) Scale from fish 134 mm., caught in April. S_1-mark presents.
(d) Scale from fish 89 mm., caught in April. s_1-mark presents.



(e) × 8



(f) × 5.5

Plate III.—continued

(e) Scale from fish 156 mm., caught in July. S_1- and S_2-mark present.

(f) Scale from fish 123 mm., caught in January. s_1- and s_2-mark present.

H. Tsukahara

Studies on the flying-fishes of the Amakusa Islands. Part 1. Faunal discussion with the life-historical notes

Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture,
Kyūshū University, Vol. 11, No. 2, August 31, 1959

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 11, No. 2
August 31, 1959

Studies on the flying-fishes of the Amakusa Islands. Part 1. Faunal discussion with the life-historical notes[1, 2]

Hiroshi Tsukahara

The present paper is a descriptive list of the flying-fishes collected off the western coast of the Amakusa Islands, Kyushu Province, Japan. Several species of the flying-fish have considerable importance economically to the fishery in this region. This fishery operates mainlys by the gill net during the summer. During my recent studies on the economical fishes of the Amakusa Islands, I began to be interested in the habits and the life histories of flying-fishes and attempted to survey the flying-fish fauna in this region. Imai (1955) recorded nineteen species in the larval stage off the southern waters of Kyushu Province, but in Amakusa region a knowledge about the flying-fish fauna was not sufficient. It will be a pleasure to me if the present study can add something to the knowledge of geographical distribution and the life histories of these flying-fishes.

This report includes thirteen species; five adult forms of the genera *Parexocoetus*, *Cypselurus* and *Prognichthys*, and thirteen immature forms of the genera *Oxyporhamphus*, *Parexocoetus*, *Exocoetus*, *Cypselurus*, *Prognichthys* and *Hirundichthys* collected by myself in 1955.

The adult form was taken by the gill net and the young, juvenile and larval forms were captured mainly by a dip net with the aid of a flood light at night. I found these methods were useful especially for collecting the flying-fishes in the various stages. Besides, collection of the juvenile was made by a dip net from their favorite hiding

[1] Contribution from the Fisheries Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University.

[2] Contribution from the Amakusa Marine Biological Laboratory, Faculty of Science, Kyushu University. No. 99.

places in the floating sea-weeds. The work has been carried out in the Amakusa Marine Biological Laboratory, Faculty of Science, Kyushu University. The Amakusa Islands are situated in the warmer temperate region, and the western coast of the outer main island opens to the East China Sea. The southern tropical fishes are brought up by Tsushima Warm Current, so that these fish fauna are rich.

Here, I wish to express my sincere thanks to Prof. Keitaro Uchida and Prof. Hiroaki Aikawa, Laboratory of Fisheries, Kyushu University, for their guidance. I also extend my thanks to Assist. Prof. Sadahiko Imai, Faculty of Fisheries, Kagoshima University for many valuable suggestions, and to Assist. Tsukasa Shiokawa and the other staff of the Amakusa Marine Biological Laboratory for their assistance in collections and technical procedures.

The list of species described is as follows;

	Scientific Name	Common Name
1.	*Oxyporhamphus micropterus micropterus* (Cuvier et Valenciennes)	Sayori-tobiuo
2.	*Parexocoetus mento mento* (Valenciennes)	Bashō-tobiuo
3.	*Parexocoetus brachypterus brachypterus* (Richardson)	Tsumari-tobiuo
4.	*Exocoetus monocirrhus* (Richardson)	Hagoromo-tobiuo
5.	*Cypselurus heterurus döderleini* (Steindacher)	Tsukushi-tobiuo
6.	*Cypselurus katoptron* (Bleeker)	Sannoji-damashi
7.	*Cypselurus opisthopus hiraii* Abe	Hoso-tobi
8.	*Cypselurus naresii* (Günther)	Uchida-tobiuo
9.	*Cypselurus starksi* Abe	Ariake-tobiuo
10.	*Cypselurus poecilopterus* (Cuvier et Valenciennes)	Aya-tobiuo
11.	*Prognichthys agoo* (Temminck et Schlegel)	Tobiuo
12.	*Prognichthys seali* Abe	Daruma-tobiuo
13.	*Hirundichthys oxycephalus* (Bleeker)	Hosoao-tobi

Oxyporhamphus micropterus micropterus (Cuvier et Valenciennes)

The specimens from this district are all immature forms and I have nine specimens, ranging from 50 mm. up to 80 mm. in fork length. These specimens were taken in July and August.

The body of the juvenile is elongated, compressed and the lower jaw produced as those in the halfbeaks, *Hemiramphidae*, and the lower lobe of caudal fin is more prolonged than the upper. The pectoral and ventral fins are short (Figs. 1, 2).

The ray counts are: Dorsal 14, Anal 14, Pectoral 12, Ventral 6.

The coloration of the body in life is bright silvery and the part of trunk is bright bluish. They were attracted to a flood light at

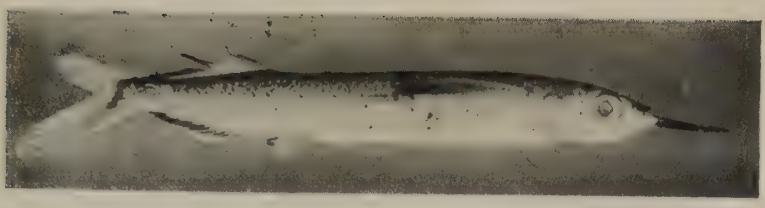


Fig. 1. Juvenile of *Oxyporhamphus micropterus micropterus*. ×1

Fig. 2. Dorsal view of juvenile. ×1

night and captured by a dip net when they lay motionless close to the water surface. They occasionally made short, sporadic flights, similar to that of *Hemirhamphidae*.

Parexocoetus mento mento (Valenciennes)

Maturing adults were collected in the period from May to October and the spawned-out were observed in this region and my material shows the series of developmental stages. This species is the smallest in size in adult among the flying-fishes taken from this region, the largest being 130 mm. in the female and 123 mm. in the male in fork length, so far as I have examined. They feed entirely on planktonic organisms, mostly copepods.

The shape of the body in adult stage is rather long and compressed; Fig. 3 shows the general appearance of the species. The dorsal fin is remarkably high and the pectoral fins are oblong and of moderate length. The ventral fins are rather short and situated somewhat far forward on the body.

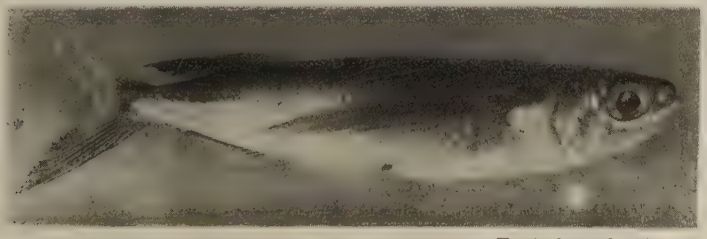


Fig. 3. Adult of *Parexocoetus mento mento*. Fork length 12 cm.

The ray counts are: Dorsal 9—10, Anal 11—12, Pectoral 12, Ventral 6.

The coloration of the body in life is dark bluish above and silvery white below and all faint yellowish. The dorsal fin is quite black excluding the base. The upper part of the pectoral is faint grayish and the ventral fins are hyaline.

The spawning season occurs from May to September and the peak is in June and July. The eggs were stripped and inseminated with the milt from the male. The embryonic development was observed and the hatched larvae were reared in the aquarium. The egg is spherical, 1.75—1.78 mm. in diameters, with about 20 long entangling tendrils distributed over the whole surface (Fig. 4). The yolk is transparent and the oil-globule absent.

Fig. 4. Eggs of *Parexocoetus mento mento*. ×ca. 10

The number of eggs in the ovary is presumed to be from about 1,000 to 2,000. The spawning seems to take place at once from the sunset to the next morning. It requires about 10 days at 21°—25°C. water temperature to hatch out. The hatching-out takes place in several hours after the sunset. The newly hatched larvae were 4.5—5.2 mm. in total length. In the larval stages the body is a little more robust and the fin rays have definitely developed, except the pectoral fins. The coloration of the body is dark brownish above and bright yellow brownish below. The ventral fins are dark greenish. Immature forms

from 10 mm. up to 48 mm. in fork length were captured numerously by a dip net under a night light. The juvenile appeared from early July to late October (Fig. 5).

Fig. 5. Eggs, larvae and juveniles of *Parexocoetus mento mento.* ×ca. 2

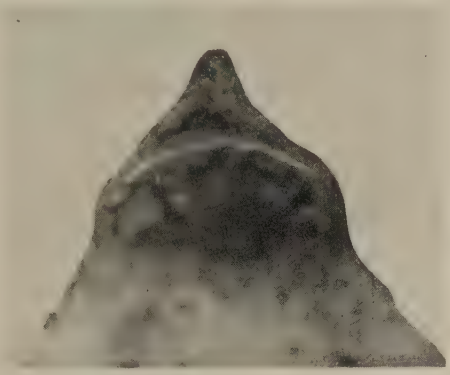


Fig. 6. Dorsal view of prolonged lower jaw. ×20

In the juvenile stages, the elevation of dorsal fin increases and the dorsal fin is wholly black, except near the base. The ventral fins are large and almost brownish. The characteristics of pigmentation are the three rows of melanophores which are situated along the dorsal, anal bases and the lateral portion of posterior body. The barbel of the lower jaw is absent, but the lower jaw produced a little as in the saury, *Scombresocidae* (Fig. 6). These small fishes spread out the four "wings" and could leap into the air for a distance of a foot. In the specimens longer than 25 mm. in fork length, the shape of body agrees with the adult form and is dark bluish above and silvery white below (Figs. 7, 8).

Fig. 7. Young of *Parexocoetus mento mento.* ×2

The growth is so rapid that the fishes almost become matured in one year. They spawned at the end of their first year and most of them seem to die after spawning. Maturity is reached at the size of about 98 mm. in fork length in the male and 119 mm. in the female.

The young shows a tendency to leave this region in winter migrating towards the southern waters.

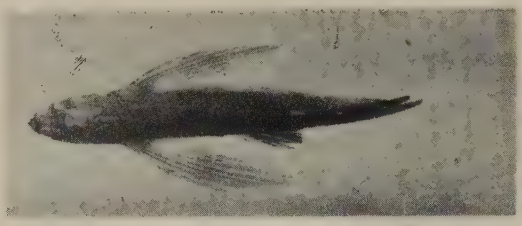


Fig. 8. Dorsal view of young. ×2

Parexocoetus brachypterus brachypterus (Richardson)

The specimens are all small in size, and ranges from 25 to 60 mm. in fork length are taken in July. Imai (1955) has recorded the capture of adults off the southern region of Kyushu, but I could not collect the adults in Amakusa region.

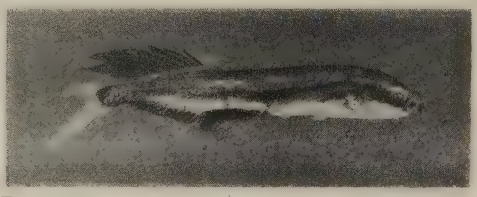


Fig. 9. Juvenile of *Parexocoetus brachypterus brachypterus*. ×1

The body of a juvenile is rather long and compressed. The midmost ray of the dorsal fin is greatly prolonged, thus giving a remarkably high shape to the fin. The pectoral fins are rather short. The ventral fins are relatively long, although those of the adult rather short (Figs. 9, 10). During earlier stages, the lower jaw has a pair of short, black barbel (Fig. 11).

Fig. 10. Dorsal view of juvenile. ×1

Fig. 11. Dorsal view of barbel of lower jaw. ×10

The ray counts are: Dorsal 13, Anal 13, Pectoral 12, Ventral 6.

The coloration of the body is dark above and silvery white below and a dark band of pigment across the eye extends to the middle part of the caudal peduncle. The dorsal fin is quite black and the anal fin is black, except in the proximal part, which is hyaline. The pectoral and ventral fins are grayish.

Two juvenile forms of *Parexocoetus*, *P. brachypterus brachypterus* and *P. mento mento*, were found in this region and in the same season. During the juvenile stage, this species is darker in the color of body and higher in dorsal fin than *P. mento mento* and has a pair of barbel under the lower jaw, but the latter is absent.

Exocoetus monocirrhus (Richardson)

The present material is all juvenile, with a maximum fork length of 58 mm. which was taken in July and August, and adults were not collected. They were captured by a dip net when they lay motionless under a night light with the pectoral fins spread out and the barbel of lower jaw prolonged anteriorly.

The body of a juvenile is short and high, and the head is elevated steeply behind the eyes. The pectoral fins are very long and the ventral fins are short and anteriorly situated (Figs. 12, 13). An

Fig. 12. Juvenile of *Exocoetus monocirrhus*. ×1

Fig. 13. Dorsal view of juvenile. ×1

unpaired barbel of the lower jaw is rather long and slightly expanded laterally with the tip being roundish and quite black (Fig. 14).

Fig. 14. Dorsal view of barbel of lower jaw. ×5

The ray counts are: Dorsal 13, Anal 13, Pectoral 15, Ventral 6.

The coloration of the body in life is brownish blue above and silvery white below, with three obscure vertical black bars on the sides. The pectoral fins are faint grayish with a black vertical band on the middle part, a black line runs along the posterior margin with black parts on the base (Fig. 12). The ventral fins are hyaline. The dorsal fin is nearly transparent, with an obscure black bar. Sometimes these small fishes would glide in the air for a distance of at least 10 feet before striking the water again under a night light.

Cypselurus heterurus döderleini (Steindachner)

This is the larger form and is of economical importance among the flying-fishes in this region. I have a large series of developmental stages.

The body of the adult is rather slender and the belly is angular along the ventral edge; Fig. 15 shows the general appearance of the species. The pectoral fins are long and reach past rear of dorsal base. The tip of the ventral fins reaches the base of the 9th anal fin-ray. The origin of the anal fin is far behind that of the dorsal fin.

Fig. 15. Adult of *Cypselurus heterurus döderleini*. Fork length 28 cm.

The ray counts are: Dorsal 12—14, Anal 9—11, Pectoral 15—17, Ventral 6. The number of vertebrae (including the urostyle) is 47—49.

The coloration of the body in life is dark bluish above and silvery white below. The pectoral fins are faint greyish violet with the exception of the central part, margin and lower part being lighter. The dorsal, anal and ventral fins are greyish. They feed entirely on planktonic organisms, mostly copepods. The adult in this region is in spawning condition and the spawning takes place in May, June and July. The number of eggs carried by an adult female varied from about 8,500 to 10,000. The eggs were stripped and inseminated with milt from the male. The embryonic development was observed and the hatched larvae were reared in the aquarium, fed with the nauplii of the brine shrimp.

The eggs are spherical, on the average 1.86 mm. in diameter, having about 50 long tendrils attached uniformly over the whole surface (Fig. 16). The hatching-out takes place in about 14 days at 20°—22°C. water temperature and in several hours after the sunset. The newly hatched larvae were about 6.3 mm. in total length and swam in the water surface and darted about very actively in the aquarium. In the

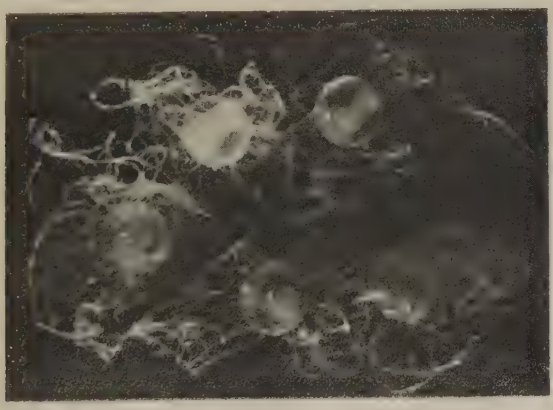


Fig. 16. Eggs of *Cypselurus heterurus döderleini*. ×ca. 5

larval stages, the shape of the body is a little robust, and with the most striking variation in color pattern, as all white, cream yellow, orange yellow, brown and dark brown. The pectoral and ventral fins are relatively large and the color is red brownish. In 25 days it attains about 14 mm. in total length and the caudal fin had begun to differenciate, lower lobe becoming longer. At this stage any disturbance in the water of the aquarium would cause these small fish to jump out of the water and glide for a short distance in the air.

Immature forms, from 14 to 110 mm. in fork length were captured numerously by a dip net under a night light. They swam sluggishly about near the light, so that they were very easily captured by a dip

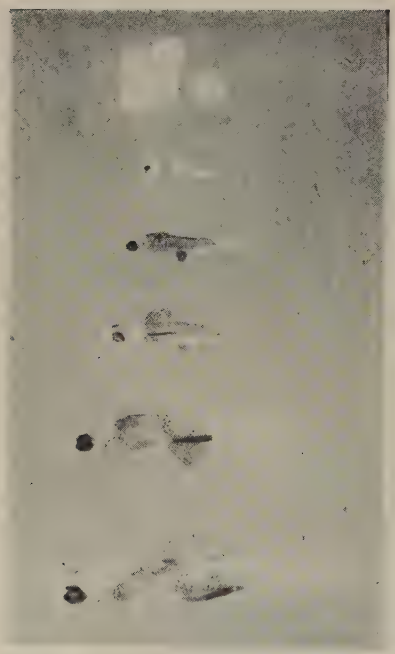


Fig. 17. Eggs, larvae and juveniles of *Cypselurus heterurus döderleini*. × ca. 2

net. In the juvenile stages, the body is slender and the coloration is bright orange yellow and has five vertical black bands on the sides.

These bands are continuous with the black parts of the dorsal and anal fins (Figs. 17, 18, 19). The juvenile larger than 15 mm. in fork length has a yellow paired barbel with the outer black flap, which is retained in the young fish, 110 mm. in fork length (Fig. 20).

In the young fish longer than 150 mm. in fork length, the shape and the color of the body nearly agree with the adult, although the middle part of the pectoral fin is pale (Fig. 21). These young fishes are of great importance in the western waters of Kyushu during October and November, and they migrate to the southern waters in winter.

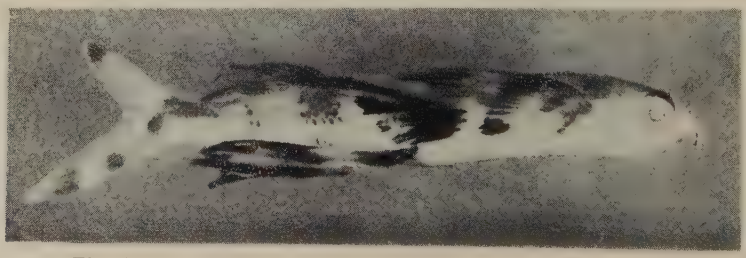


Fig. 18. Juvenile of *Cypselurus heterurus döderleini*. ×1

Fig. 19. Dorsal view of juvenile. ×1

Growth is very rapid and in one month it attains about 20 mm., in three months about 80 mm. and in one full year 250—300 mm. in fork length. Most fishes become matured and spawn at the end of the first year.

Fig. 20. Dorsal view of barbel of lower jaw. ×5

Fig. 21. Dorsal view of young. Fork length 18 cm.

Cypselurus katoptron (Bleeker)

Those at hand are 6 specimens ranging from 35 to 110 mm. in fork length, but the adult was not collected. These specimens were

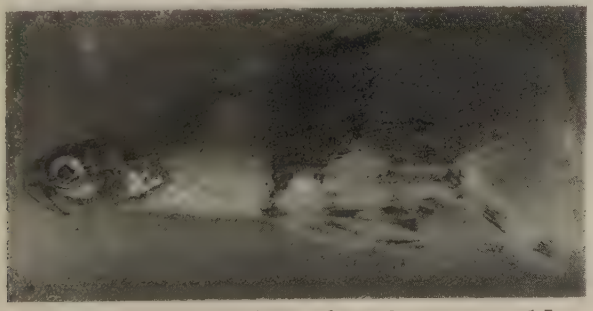


Fig. 22. Juvenile of *Cypselurus katoptron*. ×1.5

Fig. 23. Dorsal view of juvenile. ×1.5

taken in July. They were attracted to a night light with the pectoral and ventral fins spread out and a paired barbel was held forward and slightly downward. The body of the juvenile is rather robust and the pectoral and ventral fins are large (Figs. 22, 23).

The ray counts are: Dorsal 14, Anal 10, Pectoral 15, Ventral 6.

In the juvenile, the coloration of the body in life is silvery yellow, with three obscure vertical black bands on the sides. These three

Fig. 24. Dorsal view of barbel of lower jaw. ×5

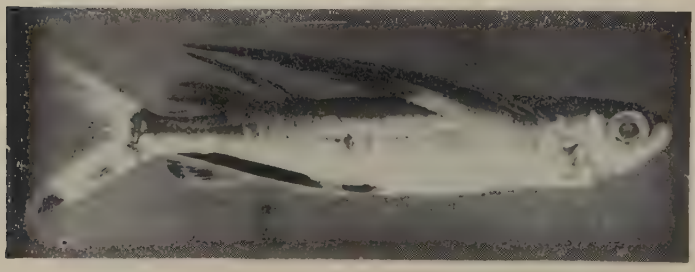


Fig. 25. Young of *Cypselurus katoptron*. ×1

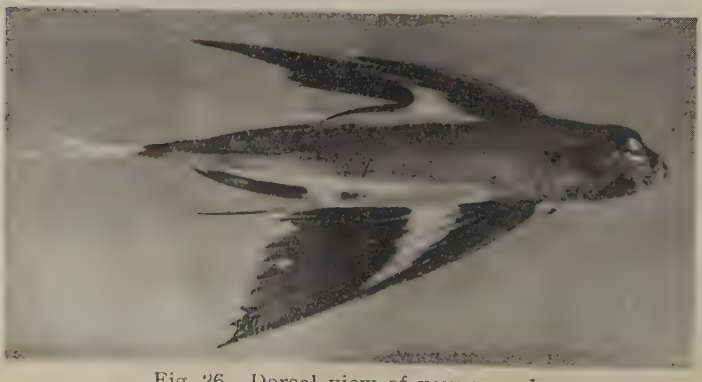


Fig. 26. Dorsal view of young. ×1

bands are continuous with the black parts of the dorsal and anal fins. The pectoral fins have a yellow part at its midmost part. During

earlier stages the lower jaw has a pair of triangular yellow barbel with the margin black (Fig. 24). In the stages longer than 75 mm. in fork length, the shape of body is slender and the coloration is black bluish above and silvery white below with the barbel being lost (Figs. 25, 26).

Cypselurus opisthopus hiraii Abe

This species is the most important economically among the flying-fishes in this region and I have a large series of material indicating the life history. The adult form is medium sized among the flying-fishes and the body is rather slender; Fig. 27 shows the general appearance of the species. The pectoral fins are long and the tip reaches at the middle of dorsal base.

Fig. 27. Adult of *Cypselurus opisthopus hiraii*. Fork length 22 cm.

The ray counts are: Dorsal 11—14, Anal 9—10, Pectoral 14—15, Ventral 6. The number of vertebrae (including urostyle) is 45—46.

The coloration of the body is dark bluish above and silvery white below. The pectoral fins are greyish violet, except the lower part is transparent. The dorsal, anal and ventral fins are greyish. The adults that appeared in this region are in spawning condition and the spawning takes place in May, June and July. The number of the eggs carried out by an adult female varied from about 4,000 to 7,500.

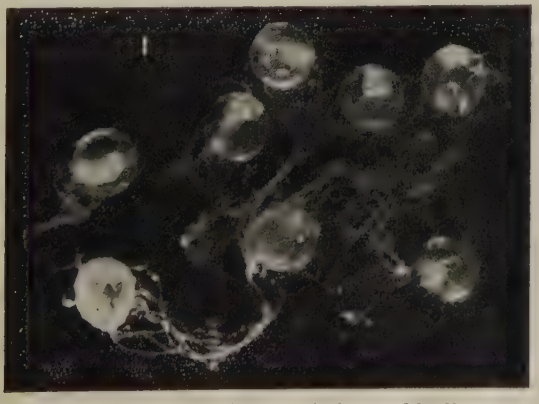


Fig. 28. Eggs of *Cypselurus opisthopus hiraii*. ×ca. 5

The eggs are spherical on average 1.47 mm. in diameter and have about 50 long tendrils attached uniformly over the whole surface (Fig. 28).

The eggs were stripped and inseminated with the milt from the male and the development was observed and the hatched larvae were reared in the aquarium, fed with the nauplii of the brine shrimp. The hatch-out takes place in about 14 days at 20°—22°C. water temperature and in several hours after the sunset. The newly hatched larvae were about 4.7 mm. in total length.

Abe (1955) considered that the natural hybrids between the present species and *Cypselurus heterurus döderleini* seem to occur infrequently, from the two points that the spawning season of both species agrees and intermediate forms sometimes occur in nature. I experimented on the hybrids between the present species and *C. heterurus döderleini* or *C. starksi*. The crossing was easily done on the mature egg and sperm, and the embryonic development was apparently normal, but the all hatched larvae died in the postlarval stage. I have not seen the intermediate form in nature during my studies.

Fig. 29. Eggs, larvae and juveniles of *Cypselurus opisthopus hiraii*. ×ca. 2

In the larval stage, the body is rather slender and reveals the temporary variation of color from nearly white to dark brown. The pectoral and ventral fins are relatively large and brownish. They swam close to the surface of water with the pectoral and ventral fins widely spread and darted about very actively by the rapid movement of the caudal peduncle (Fig. 29). In 3 days, attaining about 7 mm. in total length, they show a tendency to attach to the sea-weeds (Fig. 30). By the sudden disturbance in water, one-month old larva, about 20 mm. in fork length, leaped out beyond the fence of the aquarium of which 15 cm. high above the water.

The juvenile forms, from 20 to 105 mm. in fork length were captured numerously by a dip net under a night light. In the juvenile stages, the body is slender and the coloration is dark brownish above and black below. The juvenile longer than 12 mm. in fork length, it has a black rounded barbel (Fig. 31).

Fig. 30. Larvae attached to the sea-weed in aquarium. ×1

In advanced stages, the coloration of the body is dark bluish above, silvery on side with a longitudinal black band, and black below. The pectoral fins are black, except the lower transparent part. The ventral fins are black (Figs. 32, 33). The young, longer than 100 mm. in fork length, lacks the barbel on the lower jaw and the shape of the body and the coloration agree with the adult form, dark bluish above, silvery white below.

The growth is very rapid and in a

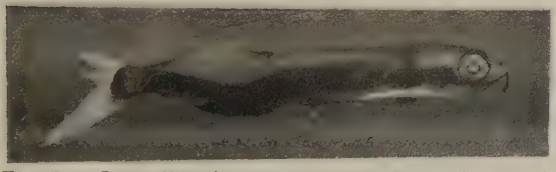


Fig. 32. Juvenile of *Cypselurus opisthopus hiraii*. ×1

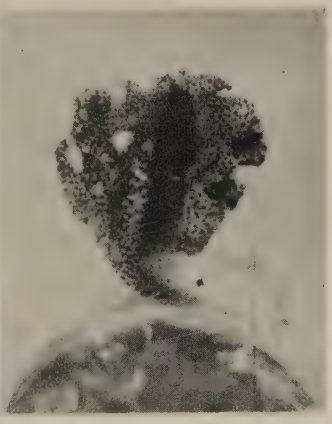


Fig. 31. Dorsal view of barbel of lower jaw. ×12

Fig. 33. Dorsal view of juvenile. ×1

month it attains about 20 mm., in three months 80 mm. and in one full year 200—240 mm. in fork length and the most of them seem to mature and spawn. These four or five month old fishes are important economically in the western waters of Kyushu during October and November, and then they show a tendency to leave there for the southern waters in winter.

Cypselurus naresii (Günther)

The present materials are all juvenile with a maximum fork length of 73 mm. and were taken in July, and the adult was not collected. The general appearance in juvenile is similar to the juvenile of *C. opisthopus hiraii*, but is distinguished by the number of vertebrae and the barbel of lower jaw. The body of the juvenile is rather slender (Figs. 34, 35). The pectoral fins are large and the tip reached to the base of lower rudimentary caudal fin-ray.

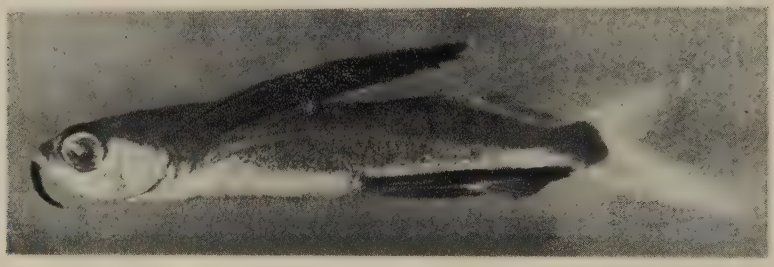


Fig. 34. Juvenile of *Cypselurus naresii*. ×1.2

Fig. 35. Dorsal view of juvenile. ×1

The ray counts are: Dorsal 12, Anal 10, Pectoral 15, Ventral 6. The number of vertebrae (including urostyle) is 42.

The coloration of the body is dark bluish above, silvery white below and has a longitudinal black band on the side. The pectoral fins are black except the lower transparent part. The ventral fins are black. The lower jaw has a considerable long black barbel like a ribbon

(Fig. 36). They were attracted to a light at night with the pectoral and ventral fins spread out and the barbel of lower jaw protruded anteriorly.

Fig. 36. Dorsal view of barbel of lower jaw. ×5

Cypselurus starksi Abe

The present species is of economical importance among the flying-fishes in this region. I have a large series of materials indicating the life history.

The adult was captured from June to August. The adult form is rather robust and medium in size among the flying-fishes with the snout rather blunt; Fig. 37 shows the general appearance. The pectoral fins are long and broad, and the tip reaches the posterior end of the dorsal base.

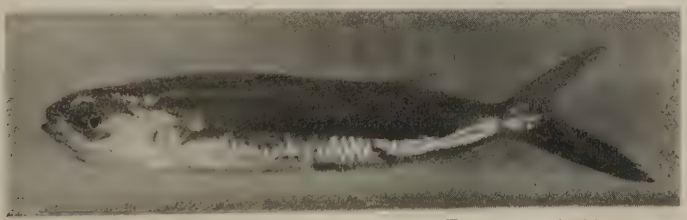


Fig. 37. Adult of *Cypselurus starksi*. Fork length 20 cm.

The ray counts are: Dorsal 12—14, Anal 8—9, Pectoral 15—16, Ventral 6. The number of vertebrae (including urostyle) is 43—44.

The coloration of the body is dark bluish above and silvery white below. The pectoral fins are bluish black and the lower part is transparent. The dorsal, anal and ventral fins are greyish.

The spawning season commences in early July and ends in August, and the spawning act seems to take place at once after the sunset till the next morning. The number of the eggs carried by one female

varied from about 4,000 to 8,000. The eggs were stripped and inseminated with milt from the male and the embryonic development were observed. The hatched larvae were reared in the aquarium, fed with the nauplii of brine shrimp.

Fig. 38. Eggs of *Cypselurus starksi*. ×ca. 7

The egg is spherical, on average 1.66 mm. in diameter with about 50 long tendrils scattered over the whole surface (Fig. 38). The hatch-out takes place in about 6 days at 26°—28°C. water temperature and in several hours after the sunset.

Fig. 39. Eggs, larvae and juveniles of *Cypselurus starksi*. ×ca. 2

In the larval stages the body is robust and the coloration varies considerably among the reared specimens and shows temporary change from yellow to dark red-brown in color pattern. The pectoral fins are greyish with the basal part slightly brownish and the ventral fin is almost dark except the marginal part. The prolarva is very heavily pigmented (Fig. 39). In one month, it attained about 17 mm. in fork length and began to jump out of the water in the aquarium by a sudden disturbance.

Immature forms, from 23—98 mm. in fork length, were captured numerously by a dip net under a night light. In the juvenile stages,

the body is robust and in coloration the majority of them appear to be rather profusely dotted with black, although they are quite brownish. The fins are all well developed and the pectoral and ventral fins are dark bluish and the lower lobe of the caudal fin is elongated (Figs. 40,

Fig. 40. Juvenile of *Cypselurus starksi*. ×1

41). These juveniles lack the barbel of the lower jaw. In the young fish longer than 150 mm. in fork length, the body is very robust and the color agrees with the adult, but the ventral fins are black.

Fig. 41. Dorsal view of juvenile. ×1

The advanced young, 120—150 mm. in fork length, are economically important together with *C. opisthopus hiraii* and *C. heterurus döderleini* in the western waters of Kyushu during October and November. These young fishes probably migrate to the southern waters in winter. The growth is very rapid and in a month attains 18 mm., in three months 80 mm., in one full year 180—220 mm. in fork length and the most fishes seem to mature and spawn.

Cypselurus poecilopterus (Cuvier et Valenciennes)

The present materials are two juvenile specimens being 60, 70 mm. in fork length, captured in August and September. The adult form

was not collected. The spawning ground seems to be far southern waters from this region.

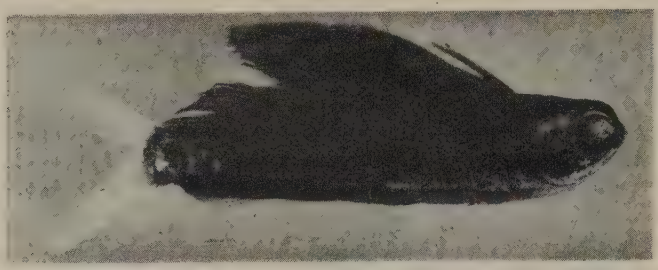


Fig. 42. Juvenile of *Cypselurus poecilopterus.* ×1

In the juvenile, the body is very robust and the belly is angular along the ventral edge and the caudal peduncle is high (Figs. 42, 43). The eyes are large. The tip of pectoral fin reaches a little beyond

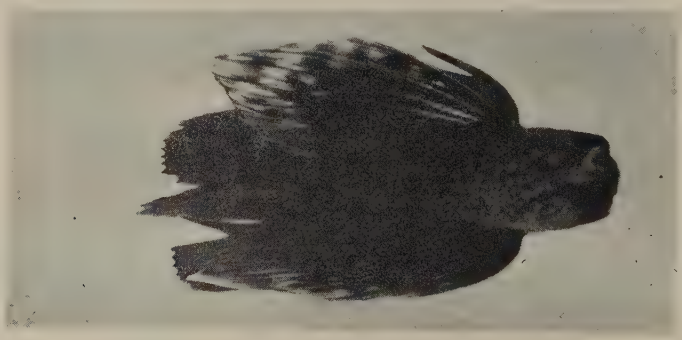


Fig. 43. Dorsal view of juvenile. ×1

the base of last dorsal fin-ray. The ventral fins are large and the tip reaches to the base of the anteriormost rudimentary fin-ray of the lower lobe of caudal fin.

The ray counts are: Dorsal 12, Anal 8, Pectoral 15, Ventral 6.

The coloration of the body in life is brownish black. The color of pectoral and ventral fins are dark brownish with brownish black spots. The dorsal and anal fins are dark brownish. The barbel of the lower jaw is absent.

Prognichthys agoo (Temminck et Schlegel)

This species is economically important in Japan, but not abundant in this region. The adult appeared in September and the juvenile was captured in July.

The adult form is rather slender and the largest in size in this region; Fig. 44 shows the general appearance. The pectoral fins are

long and the tip reaches a little beyond the base of dorsal fin. The tip of the ventral fin reaches the end of the last anal fin-ray. The origin of the anal fin is vertically below from the second to fourth of dorsal ray.

Fig. 44. Adult of *Prognichthys agoo*. Fork length 33 cm.

The ray counts are: Dorsal 10—12, Anal 11, Pectoral 17, Ventral 6. The number of vertebrae (including urostyle) is 46—48.

The coloration of the body is black bluish above and silvery white below. The pectoral fins are blue greyish and the lower part is lighter. The dorsal and ventral fins are grey and the anal fin is transparent.

In the juvenile, the shape of body is slender (Figs. 45, 46). The coloration is brownish blue above and silvery white below. Small

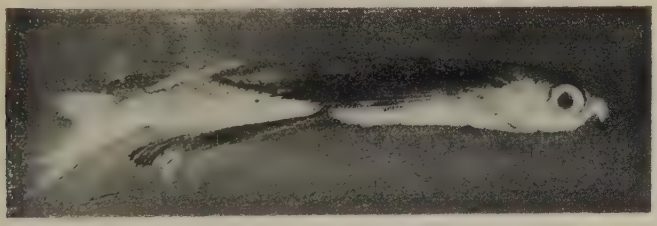


Fig. 45. Juvenile of *Prognichthys agoo*. ×1

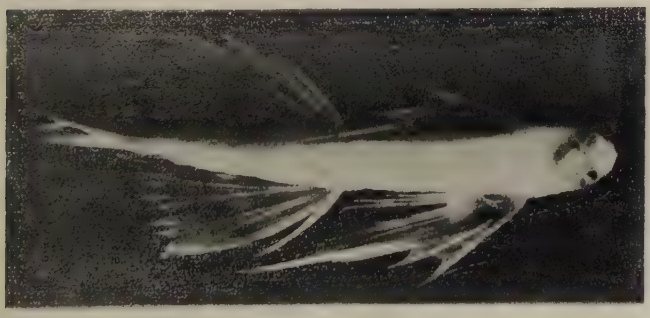


Fig. 46. Dorsal view of juvenile. ×1

melanophores are scattered over the body with five obscure black bars on the belly. The shape of pectoral fin is peculiar and is faint blackish with a quite black line along the margin and the upper part is lighter. The ventral fins are broad and the color is faint black, the

basal part paler. The lower jaw has a paired yellow barbel with black margin (Fig. 47).

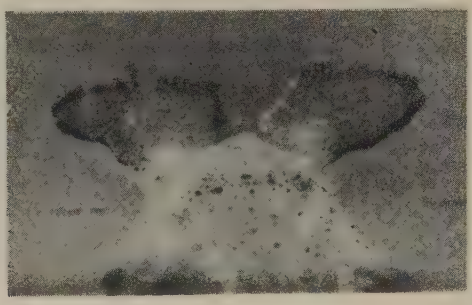


Fig. 47. Dorsal view of barbel of lower jaw. ×5

Prognichthys seali Abe

The present material is one juvenile specimen, 75 mm. in fork length, captured in July. Adult form was not collected. The body is very robust and the snout is short and the eyes are large (Figs. 48, 49). The posterior tip of pectoral fin reaches the base of last dorsal fin-ray. The tip of ventral fin reaches the origin of lower caudal fin-ray.

Fig. 48. Juvenile of *Prognichthys seali*. ×1

Fig. 49. Dorsal view of juvenile. ×1

The ray counts are: Dorsal 10, Anal 9, Pectoral 19, Ventral 6.

The coloration of the body is bluish black above and silvery below. The pectoral fin is black with the postero-dorsal margin hyaline. The ventral fin is all black. The barbel of the lower jaw is absent.

Hirundichthys oxycephalus (Bleeker)

The present material is of post-larvae, juveniles and young, ranging from 12 mm. up to 130 mm. in fork length. Immature forms are abound in this region in July, August and September, but the adult was not collected.

In the specimen measured 130 mm. in fork length, the shape of body is slender and similar to *Cypselurus opisthopus hiraii*, but differs from the latter in the position of the insertion of anal fin (Fig. 50). In the present species the anal fin is inserted nearly under the insertion of dorsal fin. The pectoral fins are long and reaches beyond the base of last dorsal finray. The tip of ventral fin reaches almost to the end of the anal base.

Fig. 50. Young of *Hirundichthys oxycephalus*. Fork length 13 cm.

The ray counts are: Dorsal 10—11, Anal 11—12, Pectoral 15—16, Ventral 6. The number of vertebrae (including urostyle) is 45 -47.

The coloration of the body is dark bluish above and silvery white

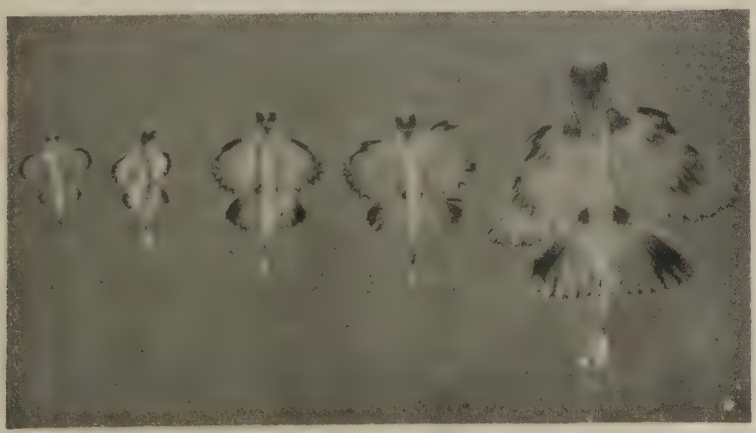


Fig. 51 Dorsal view of larvae and juvenile of *Hirundichthys oxycephalus*. ×1

below. The pectoral fins are greyish purple, lower part transparent. The ventral fins are mostly transparent, the dorsal side being dark. The dorsal and anal fins are mostly transparent.

In the larval stages, the body is slender and the color is white with the melanophores scattered over the body. The pectoral and ventral fins are roundish with the margin black (Fig. 51). In the advanced form, the appearance of pectoral and ventral fins are shown in Figs. 52, 53. The pectorals have two black cross-bands which extend from the upper part to lower, and the basal part and the outer margin are black.

Fig. 52. Juvenile of *Hirundichthys oxycephalus*. ×1

Fig. 53. Dorsal view of juvenile. ×1

In the young fish the ventral fins are relatively long, having a broad black cross-band, and the basal part and the outer margin black. The dorsal fin has a black patch in the central part. The anal fin is clear. The barbel of the lower jaw is absent. They were attracted to a flood light at night and were swimming close to the surface and skipping or sailing through the air for some distance. Young specimens are economically important off the western coast of Kyushu, being caught in October and November together with the young of *Cypselurus* species.

Literature

1. Abe, T., 1953–'56. Figures and descriptions of the fishes of Japan. Vols. 49–52.
2. ———, 1955. On a new Pacific flying-fish, *Prognichthys seali*, retaining five unbranched fin-ray above in the pectoral throughout life. Records of Oceanographic Works in Japan. Vol. 2, No. 1.
3. Imai, S., 1950. On the young stages of flying fish as the natural food for bonito. (in Japanese). Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University. Vol. 1, No. 1.
4. ———, 1952. On a Japanese flying-fish and its juvenile of the genus *Prognichthys* Breder. (in Japanese). Ditto. Vol. 2, No. 1.
5. ————, 1954. On two flying-fishes of the genus *Hirundichthys* Breder and their juveniles from Japan. (in Japanese). Ditto. Vol. 3, No. 2.
6. ————, 1955. The juvenile of the flying-fishes from the southern waters of Kyushu. (in Japanese). Tsushima Danryu Kaihatsu Chōsa Kenkyu Hōkoku. No. 2.
7. Ueno, M. and Nakahara, K., 1955. On the development of eggs and rearing of larvae of a flying fish, *Cypselurus starksi*. (in Japanese). Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University. Vol. 15, No. 1.

Fisheries Laboratory,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University

LIFE-CYCLE OF A SPECIES OF *BATRACHOSPERMUM* FOUND IN NORTHERN KYUSHU, JAPAN

TADAO YOSHIDA

Reprinted from
Japanese Journal of Botany
17 *(1): 29–42*

TOKYO
1959

Jap. Journ. Bot., **17** (1): 29-42 (1959)

LIFE-CYCLE OF A SPECIES OF *BATRACHOSPERMUM* FOUND IN NORTHERN KYUSHU, JAPAN[1),2)]

TADAO YOSHIDA[3)]

In a detailed investigation, Sirodot [12] confirmed that plants belonging to the genus *Batrachospermum* pass through a simple developmental stage called the *Chantransia*-stage, which is known not only in this genus but also in some related genera. He also stated that the carpospores formed as a result of sexual reproduction grew into the *Chantransia*-stage, and that the thallus of the *Chantransia*-stage reproduced itself asexually by monospores. Osterhout [9] observed the process of fertilization in *Batrachospermum boryanum*. Kylin [7] made cytological studies of *Batrachospermum moniliforme*, and assumed that reduction division took place in the carpogonium immediately after fertilization. He also described the germination of carpospores. In Japan, Saida [11] reported briefly on the life-cycle of *Batrachospermum* and confirmed the observations made by Sirodot. Geitler [3] also observed the germination of carpospores in *Batrachospermum* sp.

As stated above, the life-cycle of *Batrachospermum* has been clarified to some extent, but not all aspects of the supposed life-cycle have actually been established through culture experiments.

The author is happy to express his sincere thanks to Dr. S. Segawa of the Faculty of Agriculture, Kyushu University for his kind guidance throughout this investigation. Thanks are also due to Dr. R. F. Scagel of the University of British Columbia for his kindness in reading the original manuscript.

MATERIALS AND METHODS

The material used in this investigation has not been identified as to species, but it is described in detail from both the morphological and the anatomical standpoints in the following section. The species of *Batrachospermum* studied was found in an irrigation stream flowing out of a well-spring at Hirao, in the suburbs of Fukuoka, northern Kyushu, and was growing on small stones and the roots of other plants. The seasonal changes in growth were observed mainly in this stream. Small pieces of glass plate were laid down in this stream and the development of the spores adhering to these glass plates was observed throughout the year. At the same time, plants of *Batrachospermum* growing in a small spring near the stream were also observed for comparison.

Culture experiments were carried out in the laboratories of Tobata High School in 1954 and Kyushu University in 1955, 1956 and 1957. In order to collect carpospores or monospores, a thallus of *Batrachospermum* bearing many ripe cystocarps, or stones covered with the thalli of the *Chantransia*-stage which were

1) Contribution from the Fisheries Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University.
2) Contribution No. 1, from "the Research Group on the Life-cycle of Red-algae" (Research Director—Dr. S. Segawa).
3) Fisheries Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

previously ascertained to have ripe monosporangia, were brought into the laboratory. The fertile materials were placed in glass dishes or china vats filled with well-water and containing glass slides. After one or two days, spores became attached to the surface of the slides. Culture experiments of rather short term were carried out in standing water, which was replaced every 3–5 days, and those of long term in running water.

Cytological studies were carried out using the material collected from the lower part of the stream. The material was fixed chiefly in Flemming's weaker solution at the time it was collected in the field or after it was brought back to the laboratory. The aceto-carmine method as modified by Rao [10] was used for staining. The material was stained without sectioning. Rao's method is as follows:

1. Fix (Rao used acetic alcohol fluid).
2. Treat about 10 minutes in iron alum solution.
3. Rinse with distilled water (10 to 20 minutes).
4. Stain in ordinary aceto-carmine solution.

After staining, the material was squashed and observed.

OBSERVATIONS

1. *Morphology of Batrachospermum used in this investigation*

The thallus reaches a length of 8–10 cm. and has a rather dense monopodial branching habit. It is light brown, sometimes rather bluish or greenish in colour, very mucilaginous, and adheres to paper when dried. This species is dioecious, but male and female plants are distinguishable only at maturity.

The thallus consists of a main axis bearing whorls of repeatedly branched primary laterals. Near the tip of the thallus, the adjacent whorls come in contact and are discoid in shape. In the proximal part of the axis the whorls, which are easily distinguished from each other, become thicker and sometimes nearly spherical in shape, giving a moniliform appearance. This condition is especially true in the male plant[4] (Fig. 1 A, B). The external appearance of the species varies to some extent according to the habitat.

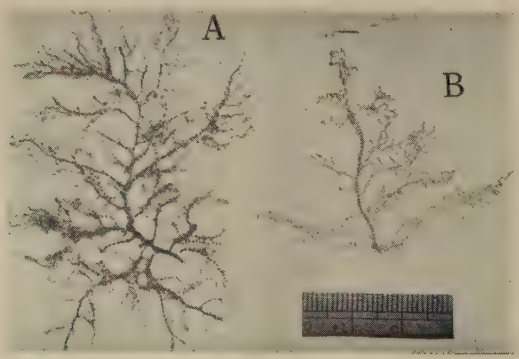


Fig. 1. *Batrachospermum* sp.
A. Female plant. B. Male plant.

The basal cells of the primary lateral give rise to rhizoidal filaments which cover the cells of main axis. Primary laterals ramify 6–10 times, and the ultimate branches of the lateral rarely terminate in hairs. When present the latter are short in length. Secondary laterals develop very rarely.

Male plants seem to be less

4) The specimens are deposited in the herbarium of Fisheries Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University.

abundant than female plants and are smaller in size. Spermatangia are formed at the tips of the laterals (Fig. 2 B). The laterals bearing spermatangia are richly branched, especially in the upper part. The spermatium is spherical, 6–7 μ in diameter, and does not contain a chromatophore at maturity. A part of a chromatophore is present in the spermatium at the early stage, but it disappears in the course of maturing. The spermatium has no membrane when it is released, but develops a thin membrane after it becomes attached to a trichogyne.

The carpogonium is terminal on the carpogonial branch, which is hardly distinguishable from primary laterals in the early stage (Fig. 2 A, D). The carpogonial branch which consists of 10–16 cells, is almost equal in length to the

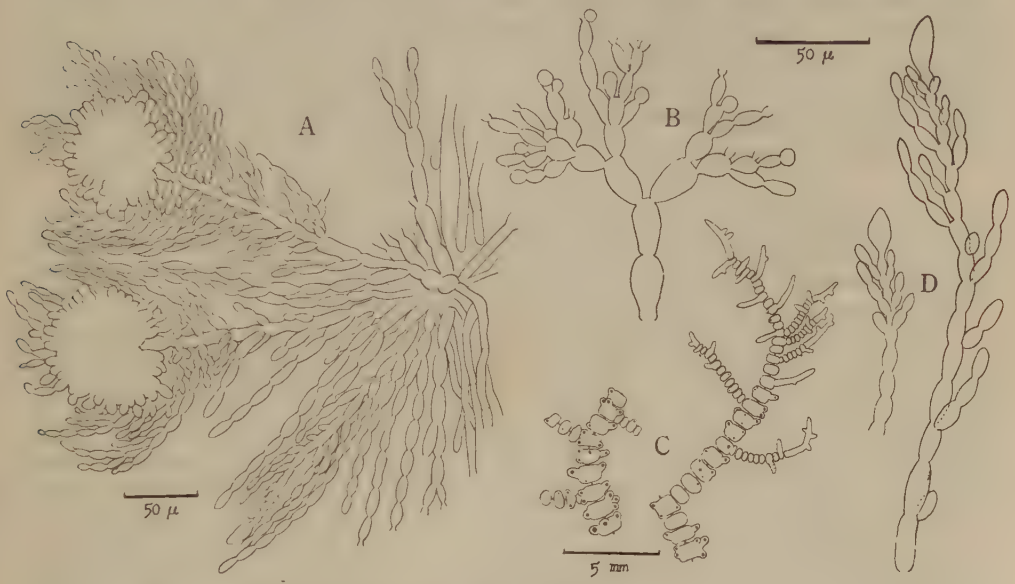


Fig. 2. A. A portion of whorl with carposporophytes. B. A part of lateral bearing spermatangia. C. Portions of the female plant showing the position of carposporophytes. D. Carpogonial branches.

laterals, so that the carpogonium is situated at the periphery of the whorl. Rarely a side branch of the carpogonial branch also bears a carpogonium. The trichogyne is ellipsoid in shape, 25–30 μ long and 7–9 μ wide (Fig. 2 D). After fertilization each cell of the carpogonial branch becomes enlarged and from these large cells project many short laterals (Fig. 2 A). The latter partly surround the carposporophyte, developing like whorls, and sometimes give rise to an elaborate structure with rhizoidal filaments as in the main axis. As a result, the carposporophytes may be situated outside or at the periphery of the whorl.

The characteristics of the species described above can be summarized as follows: 1) the secondary laterals develop very rarely, 2) hairs are very few in number, 3) the species is dioecious, 4) the trichogyne is ellipsoid in shape, 5) the carposporophyte is situated at the periphery or outside of the whorl, and 6) the

carpogonial branch gives rise to laterals in the form of whorls.

2. *Seasonal changes of the thallus in natural habitats*

The following description of seasonal changes in the thallus of this species of *Batrachospermum* is a result of observations made mainly in 1955.

The thalli of *Batrachospermum* were not observable throughout the summer. They attained their maximum growth from January to April, decreasing gradually thereafter, and vanishing completely in late June. Small buds of *Batrachospermum* could be seen in early November. They reached a height of 2–3 cm. by January, 1956. In a small spring near the stream, the thalli of *Batrachospermum* appeared earlier than in the stream. Duration of the thallus varied according to the habitats. This difference may be attributable to the water temperature. As the thalli of *Batrachospermum* disappear in summer, they are annual in this district, but it is said that the thalli of some species are found almost all the year round in Hokkaido. In Sweden, Kylin [5] reported that all species found there mature in summer months.

3. *Chantransia-stage*

The thalli of the *Chantransia*-stage form bushy patches or dense carpets on the substratum. Although they become several millimetres high when well developed, they develop poorly in the above-mentioned locality.

The thallus consists of prostrate and erect parts. The prostrate part, which covers the surface of the substratum, is composed of irregularly branched filaments of short creeping cells. The erect part, which is made up of uniseriate filaments, originates from the prostrate part, and when well-developed, ramifies several times. Cells of the erect filaments are 8–10 μ wide and 15–30 μ long, and each cell contains an irregular, parietal, yellow-green or yellow-brown chromatophore. Monospores are formed singly or in pairs at the tip of a side branch[5].

Differentiation of the thallus of *Batrachospermum* from the *Chantransia*-stage (Sirodot uses the term 'metamorphose') begins in November, and is seen till February of the next year in the above-mentioned stream. The thalli of *Batrachospermum* are formed as lateral buds on the filaments of the *Chantransia*-stage. The bud is distinguishable from the latter even in the very early stage. When the bud reaches a length of several cells, its cells divide longitudinally to form basal cells of the laterals, resulting eventually in the structure seen in the adult thallus (Fig. 3 A–C). When the young shoot of *Batrachospermum* reaches a size such that it is visible to the naked eye, rhizoidal filaments arise from the basal cell of the primary laterals and adhere to the substratum (Fig. 3 D).

For the purpose of observing the attachment of spores, several small pieces of glass plate were placed in the stream each month from March to July, 1955. The results obtained from a study of these plates are as follows.

In April, branched prostrate filaments were observed on the pieces of glass laid down in March, and one-celled erect filaments, which reached a length of

5) The author once observed in a culture inflated cells resembling the monosporangia formed on the creeping filaments, but could not confirm the nature of them because of the scarcity of the material.

several cells in May, were already present. No germlings were observed in May on the glass plates submerged in April.

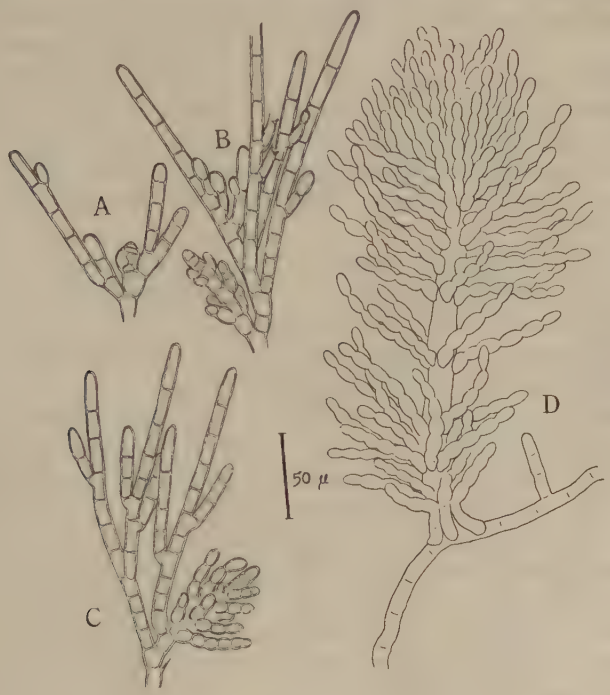


Fig. 3. A–D. Development of the thallus of *Batrachospermum* from the *Chantransia*-stage.

TABLE 1

Attachment of spores to glass plates laid down in the stream

Date of glass plates submerged	Date of observation							
	18/IV	13/V	4/VI	25/VI	14/VII	23/IX	6/XI	18/XII
22/III	+	++	++	++	++	+	+	+
18/IV		–	+	+	+	+	+	+
13/V			+	+	+	+	+	+
4/VI				+	+	–	+	+
14/VII						+	+	+

– indicates the absence of germlings
\+ indicates the presence of germlings
++ indicates the luxuriant growth of germlings

According to observations made in June, well-developed germlings were found on the glass plates submerged in March. The erect filaments had reached a length of about 10 cells, and the densely ramified prostrate part had formed a somewhat discoid mat. No erect filaments were seen on the glass submerged in May.

Observations made in July revealed that on the glass plates laid down in March the cluster of germlings was more than 1 mm. in diameter and had formed yellow-green patches visible to the naked eye, although the erect filaments were without ramification. Relatively well-developed germlings were seen on the glass plates submerged in April, and some germlings were observed on the glass plates started in June.

In September, a black precipitate on the pieces of glass made the examination difficult, and it diminished the growth of the *Chantransia*-stage. The germlings were observed on the glass plates started in July.

Buds of *Batrachospermum* were found also on the pieces of glass in December, although the *Chantransia*-stage developed very poorly.

These observations include the germlings both from carpospores and monospores. The germlings from carpospores differ from those from monospores in the early stage, as described in the following section, but they are not distinguishable at a more advanced stage of development.

It seems probable that the germlings attached on the glass pieces laid down in July, and thereafter, might come from monospores because of the absence of *Batrachospermum* thalli in these months. The presence of monospores in these months is known from observation, although the *Chantransia*-stage bearing monospores was not discovered. It is probable that the *Chantransia*-stage propagates vegetatively, as suggested by Sirodot, but the author did not confirm this mode of propagation.

4. *Culture experiments with carpospores*

At the time of liberation carpospores are spherical, 8–10 μ in diameter, and each carpospore has a single yellow-brown chromatophore (Fig. 4 A). Although the carpospores are naked when liberated, later they develop thin membranes. One or two days after liberation, carpospores begin to germinate. Sometimes they germinate close by the carposporophyte and entangled among the laterals of the mother plants. Kylin [7] and Geitler [3] observed a similar phenomenon in the germination of carpospores. It is uncertain whether or not spores that germinate on the mother thallus can later become adherent to the substratum, but the mode of germination seems to be identical with that on the glass slide.

On germination, a process arises from one side of the spore, and develops into a germ tube (Fig. 4 B, C). By the time the germ tube becomes twice as long as the diameter of original spore, most of the cytoplasm passes into this germ tube, and the latter is cut off by a septum at the slightly constricted basal part to form an initial cell of the germling (Fig. 4 D, E). The germ tube elongates, and by transverse division, initiates a uniseriate creeping filament (Fig. 4 F, G). When the germlings become 3–4 cells long, in many cases they give rise to

the first branch, which is formed from the cell nearest to the original spore, the initial cell (Fig. 4 H, I). Thereafter the branches originate from the other cells of the filament, forming an irregularly-branched prostrate part (Fig. 4 J). Each cell of the creeping filament contains parietal chromatophore of irregular shape.

In a culture experiment started with carpospores and using material collected from the spring, in July, 1956 the germlings, which grew in accordance with the mode of germination described above, gave rise to erect filaments. These erect filaments rarely ramified in summer months. Young shoots of *Batrachospermum* were discovered on the filaments of the *Chantransia*-stage in January, 1957. They gradually grew larger, and reached a height of about 3 millimetres in March. Although no thallus with a carposporophyte was found at this time, male individuals with mature spermatangia were seen. Thereafter, the growth of *Batrachospermum* diminished little by little. The shoots of *Batrachospermum* disappeared entirely in July, but the patches of the *Chantransia*-stage without monospores were still present. In this year, monospores were found on the filaments of the *Chantransia*-stage from January to April. These monospores were attached successfully on the other glass slides in March, and they germinated to form branched prostrate filaments following to the method described in the next section. These germlings were destroyed by a growth of diatoms after two months. It is evident from this experiment that the *Chantransia*-stage is not annual. The culture experiments described here are summarized in Fig. 5.

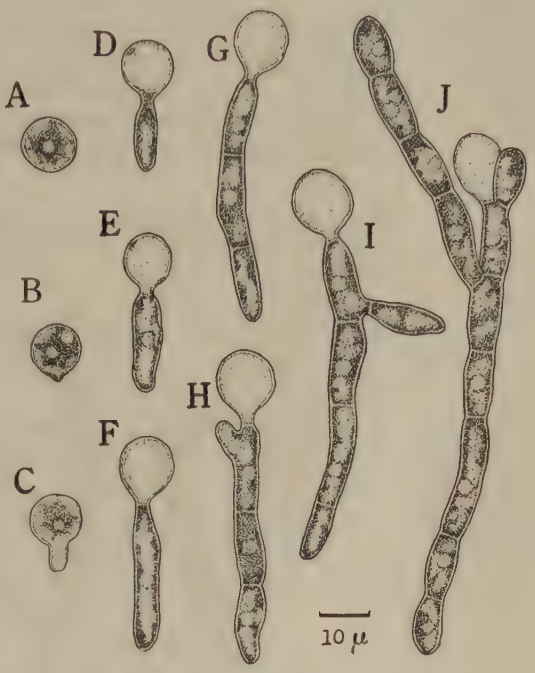


Fig. 4. Germination of carpospores.
A. Settled carpospore. B, C. 2 days old germlings. D, E, F. Formation of the initial cell, 6 days old. G, H. 10 days old germlings. I. Branching of prostrate filament, 14 days old. J. Germling of 30 days old.

5. *Culture experiments with monospores*

Monospores are formed singly or in pairs on the tip of a side branch of the *Chantransia*-stage filament. They are about 10 μ in diameter, and are naked when liberated, hardly distinguishable from carpospores (Fig. 6 A). One or two days after attaching to the glass slide, they begin to germinate, pushing out a germ tube from one side into which passes almost all the cytoplasm of original

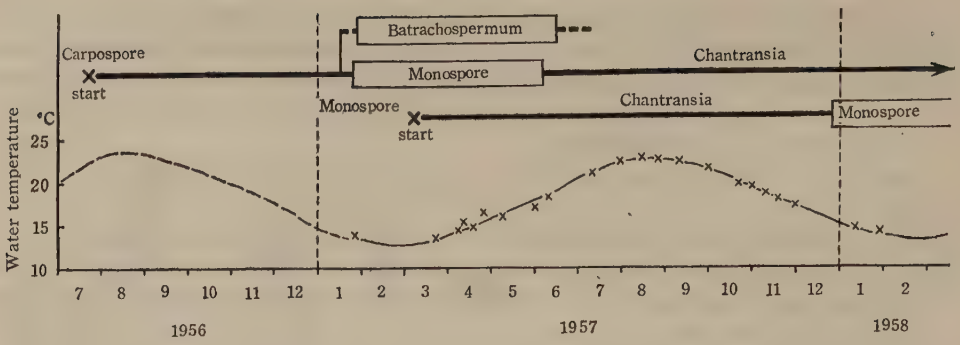


Fig. 5. Culture experiment with carpospores and monospores.

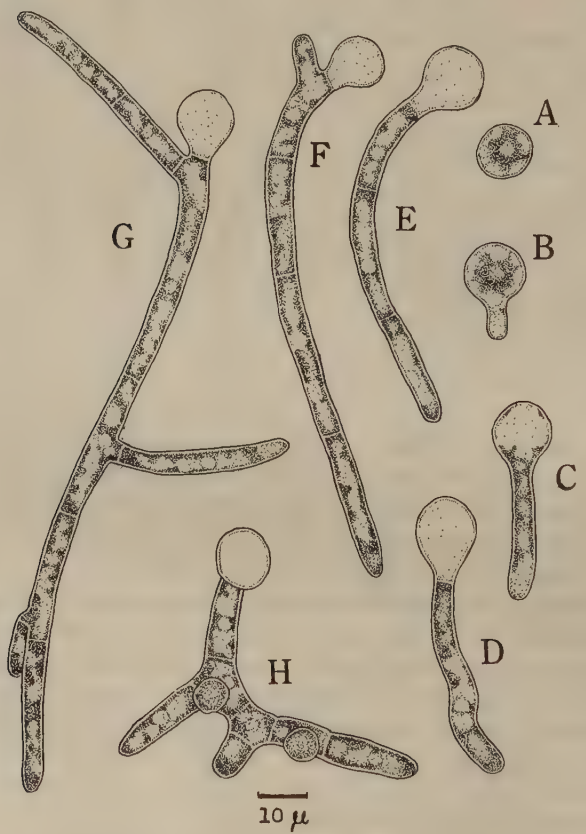


Fig. 6. Germination of monospores.

A. Settled monospore. B, C. 2 days old germlings. D. Formation of the initial cell, 5 days old. E. 8 days old germling. F. Ramification of prostrate filament, 14 days old. G. Germling of 30 days old. H. Germling with erect filaments.

spore (Fig. 6 B, C). Empty spore hulls become slightly larger in diameter. By the time the germ tube reaches a length 2–4 times the diameter of the original spore, the germling gives rise to a septum near the base and, following transverse division, becomes a uniseriate filament (Fig. 6 C–G). No constriction, however, is found at the base of the germ tube, as occurs in the germling from the carpospore. The chromatophore is the same as in the germling from the carpospore. The first erect filament originates from a 6–10 celled germling (Fig. 6 H). Later, the erect filament branches a few times. In the culture experiment carried out in 1957, the germlings continued throughout the summer in this state and formed monosporangia in December, although no buds of *Batrachospermum* were observed on them.

6. *Development of the carposporophyte and cytological observations*

The cells of *Batrachospermum* are, as already shown by Kylin [7], always uninuclear. The nucleus, which has one large nucleolus, is about 3–4 μ in diameter in the ordinary vegetative cell. The nuclear cavity is not stained with carmine or other dyes. In the prophase nucleus, small chromatin granules are visible.

The trichogyne has no chromatophore in it. The carpogonium is smaller than the trichogyne, and contains one nucleus. The trichogyne nucleus commonly reported in many other Floridean species has not been observed (Fig. 7 A). After the spermatium nucleus reaches the carpogonium, the membrane of the basal part of trichogyne becomes thicker, and eventually the connection between the carpogonium and the trichogyne is closed (Fig. 7 B, C). The trichogyne is apparent till the carposporophyte develops to some extent.

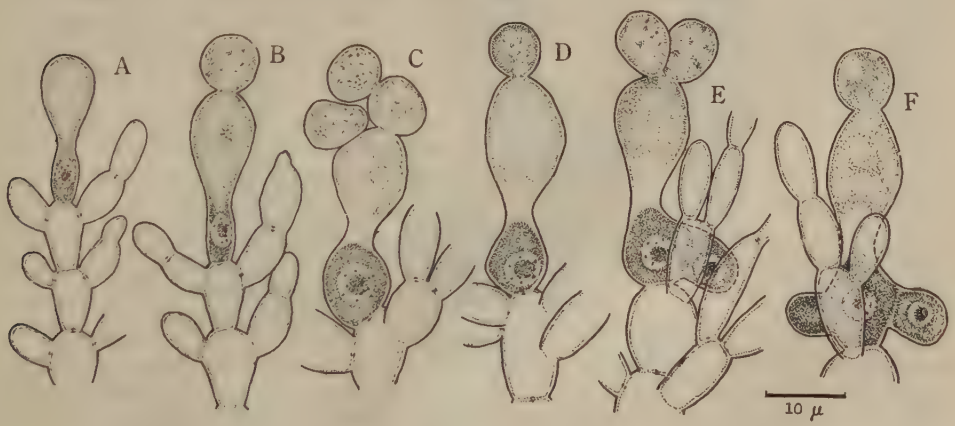


Fig. 7. Fertilization of carpogonium and early development of carposporophyte.

It might be expected that in the genus *Batrachospermum* the first division of zygote nucleus is meiotic, as in the other haplobiontic members of Nemalionales. However, the author was prevented from following the process of nuclear division by such difficulties as the small size of nucleus, and rare occurrence of

suitable material because of the proximity of the projecting bracteal branchlets arising from the supporting cells of carpogonium before and after fertilization. Since the state of diakinesis in the prophase nucleus was not ascertained, there is no direct evidence that meiosis takes place in the carpogonium.

The carpogonium gives rise directly to gonimoblast filaments. After fertilization the carpogonium grows larger, bulges out to one side, and cuts off a gonimoblast initial. Later a swelling is formed on the other side of the fertilized carpogonium (Fig. 7 D–F). It is believed that the four nuclei produced as a result of meiosis all take part in the development of gonimoblast filaments. The gonimoblast filaments gradually develop to form a compact mass with dense ramification, the carposporophyte. The terminal cell of the gonimoblast filament changes into a carposporangium which produces one carpospore at maturity.

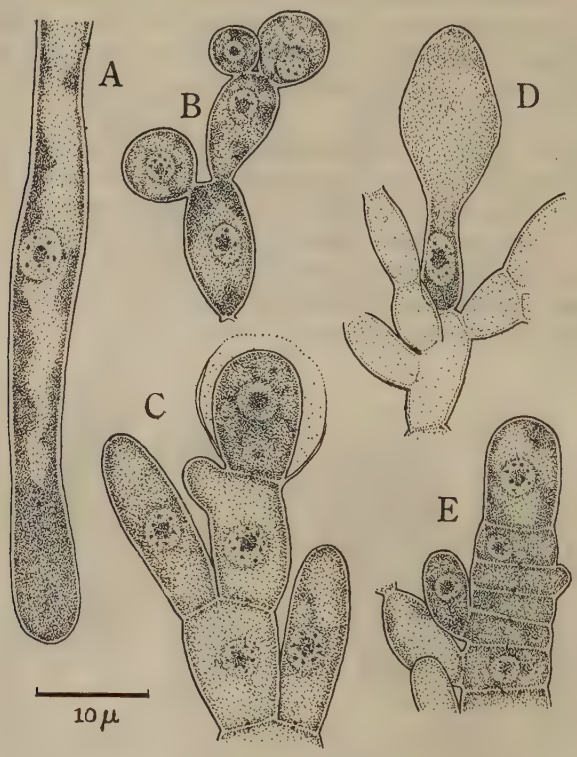


Fig. 8. Various portions of the thallus showing prophase nuclei.

The prophase nucleus in the cell of the gonimoblast filament contains chromatin granules which are similar in number to that in the nucleus of spermatium or vegetative cell (Fig. 8 A–E).

Simultaneous with the development of the gonimoblast filaments, each cell of carpogonial branch grows larger both in diameter and in length, and gives

rise to many short laterals, some of which surround the carposporophyte.

The spermatium mother cell is hardly distinguishable from other cells of the lateral, although sometimes it is somewhat larger in diameter. It is generally agreed that the nucleus in the young spermatangium is in the resting stage and this has been confirmed in the present study. The nucleolus disappears during maturation of the spermatangium, and at the same time some chromatin granules appear scattered through the nuclear cavity (Fig. 8 B). This state is interpreted as the prophase of a nuclear division, and it is suggested that the number of granules found in the nucleus of a mature spermatium coincides with the haploid chromosome number. It is difficult to count these granules precisely because of their small size and also because the mature spermatium contains many additional granules somewhat similar to them. The liberated spermatium is uninucleate. It cannot be determined from the author's preparations whether or not the spermatium nucleus undergoes a division after attaching to the trichogyne as Kylin [6] has described for *Nemalion multifidum*.

The most suitable place in which to observe the nucleus in the vegetative tissue is the terminal cell of the rhizoidal filaments covering the main axis. A similar number of chromatin granules is observed in these rhizoidal cells (Fig. 8 A).

DISCUSSION

The germlings both from carpospores and monospores demonstrate the method of germination described by Inoh [4] as 'der mittelbare Fadentypus'[6], although the germling of the carpospore is distinguishable in the early stage from that of the monospore in having a slightly constricted part at the base of its germ tube. Both germlings give rise to branched prostrate filaments, with erect parts originating from them, and develop into the *Chantransia*-stage. Sirodot [12] distinguishes 'Prothalle' and '*Chantransia* (Form asexueé)' as early stages of *Batrachospermum*. Prothalle, according to him, consists of prostrate and erect parts, but the latter develop to a lesser extent, are microscopic in size, and very rarely form monospores. *Chantransia* grows to a length of about 1 cm., and its erect part is profusely branched and produces many monospores. The author is of the opinion that it is unnecessary to accept these obscure distinctions, but it is apparent that the shoots of *Batrachospermum* originate not so much from the well-developed *Chantransia*-stage as from that of a poorly developed one.

It is ascertained from culture experiments, as shown in the preceding section, that the *Chantransia*-stage developing from the carpospore produces monospores which germinate into a filamentous growth similar to the mother plant, and can produce the shoot of *Batrachospermum* in the same year. Although the author has not been able to obtain the shoot of *Batrachospermum* from the *Chantransia*-stage which originated from a monospore in culture, it may be assumed that the *Chantransia*-stage which came from monospore will give rise to the thallus of *Batrachospermum*. On the other hand, Saida [11] says, in his brief report, that

6) The author quotes here his German term, which is considered to be correct.

he obtained the *Chantransia*-stage from carpospores of a species of *Batrachospermum* (he refers it to *B. coerulescens* Sirodot) and that monospores formed on the *Chantransia*-stage in culture grew into thalli similar to that of the mother plant.

It can be said with some certainty that the number of chromatin granules appearing in the prophase nucleus—believed to coincide with the chromosome number —is about 10 in all. As the author has not been able to observe all the stages in nuclear division, partly because of the smallness of nucleus, it is difficult to determine the exact chromosome number. Kylin [7] states that the number is about 10 in *Batrachospermum moniliforme*. Yamaha and Suematsu [14] report that there are Feulgen-positive granules in the nucleus of two species of *Batrachospermum*, i.e., *B. moniliforme* and *B. virgatum* (?), but they say nothing about the chromosome number. As the chromatin granules found in the nuclei of gonimoblast filaments, vegetative cells and spermatia are nearly similar in number, it seems fairly certain that meiosis takes place in the carpogonium immediately after fertilization, although there is no direct evidence. The species of *Batrachospermum* under study is, therefore, considered to be haplontic, as previously mentioned.

Before describing the life-cycle of the species of *Batrachospermum* under consideration from the above-mentioned facts, some attention must be given to the terms used in the interpretation of the phenomena for the general understanding of the life-cycle found in the algae.

During the early period of the study of the life-cycles of the algae, great emphasis was placed only on the nuclear phase, and it was considered that the morphological generation should be comprehended from the nuclear phase, as a result of the studies made by Svedelius [13] and others. More recently, Feldmann [2] and Drew [1], on the contrary, treat the nuclear phase and morphological phase separately, and Feldmann, using the term 'phase' for the nuclear phase and 'generation' for the morphological phase, considers the life-cycle as a combination of them. Drew, on the other hand, does not employ the term generation because it is difficult to define, and uses the term nuclear phase and somatic phase respectively.

The term 'stage' may be applied to a period in the life-cyle of an alga provided with distinct morphological characters as a developmental step. The *Chantransia*-stage of *Lemanea*, a genus related to the genus *Batrachospermum*, is believed to lack monospores, and be properly called as stage in its original meaning. On the other hand, in the multiaxial members of the Nemalionales, for example *Nemalionopsis tortuosa* Yoneda et Yagi (Okada and Migita [8]), germination of the spore is nearly the same as in *Batrachospermum*, and a prostrate part gives rise to an erect part, from which an adult thallus is formed without distinct morphological changes. Multiaxial Nemalionales are, therefore, considered to have no distinct developmental stage.

Drew [1] considers, with some hesitation, the *Chantransia*-stage of *Batrachospermum* as a somatic phase and gives it the name protogametophyte, because it shows constant and definite characteristic morphological features, produces re-

productive cells, the monospores, and its differentiation into the thallus of *Batrachospermum* is localized and sudden. But it would be rather difficult to refer to the *Chantransia*-stage of *Lemanea* as a stage and that of *Batrachospermum* as a generation or somatic phase, if we take into account that the difference between them is slight, except the existence of a reproductive organ in the latter. The author is, therefore, of the opinion that it should be referred to as a stage, and not a generation or somatic phase in the life-cycle. The number of generations or somatic phases would be considered as two, namely the thallus of *Batrachospermum* (including the *Chantransia*-stage) and the carposporophyte, and the life-cycle of *Batrachospermum* in question can be called diphasic, after Drew's terminology, or digénétique, according to Feldmann. The nuclear phase can be considered as monophasic (monophasique), because meiosis apparently takes place immediately after fertilization.

SUMMARY

1. The germling arising from the carpospore differs from that from the monospore in having a constricted part at the base of its germ tube. Both germlings, however, show the same method of germination, 'der mittelbare Fadentypus' as defined by Inoh [4].
2. The *Chantransia*-stage of this species of *Batrachospermum* is observed at all times of the year, while the monosporangia are mainly produced from November to April of the following year. The thalli of *Batrachospermum* arise as lateral buds on the erect filaments of the *Chantransia*-stage.
3. Thalli of *Batrachospermum* can be seen from November to June of the following year, and are absent during the other months. In this district, therefore, the *Batrachospermum* described is an annual.
4. It is confirmed through culture experiments that the carpospore gives rise to the *Chantransia*-stage, which forms the thallus of *Batrachospermum*, and that monospores formed on the *Chantransia*-stage germinate and develop into the same stage. Monospores collected from natural habitats give rise to the same *Chantransia*-stage as in the case of carpospores.
5. Chromatin granules found within the nuclear membrane of prophase nuclei of the spermatium, gonimoblast and vegetative cells are almost similar in number. It is, therefore, assumed from this fact that reduction division takes place in the carpogonium immediately after fertilization.
6. The *Chantransia*-stage of this species of *Batrachospermum* is considered as a stage of development, and not as a distinct generation or somatic phase as interpreted by Drew.

REFERENCES

1. DREW, K. M. Life histories in the algae, etc. *Biol. Rev.* **30**: *343–390.* (1955)
2. FELDMANN, J. Les cycles de reproduction des algues et leurs rapports avec la phylogénie. *Rev Cytol. et Biol. Vég.* **13**: *1–49.* (1952)

3. GEITLER, L. Die Keimung der Karposporen von *Batrachospermum*. *Planta*, **26**: *1–5*. (1936)
4. INOH, S. Development of algae. Hokuryukan, Tokyo. (in Japanese). (1947)
5. KYLIN, H. Studien über die schwedischen Arten der Gattungen *Batrachospermum* Roth und *Sirodotia* nov. gen. *Nov. acta reg. sos. sci. Upsaliensis*, Ser. IV, **3**: 1–40. (1912)
6. ———, Über die Befruchtung und Reduktionsteilung bei *Nemalion multifidum*. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **34**: *257–271*. (1916)
7. ———, Über die Entwicklungsgeschichte von *Batrachospermum moniliforme*. ibid., **35**: *155–164*. (1917)
8. OKADA, Y., AND MIGITA, S. On the life-history of *Nemalionopsis tortuosa*. *Sci. Rep., Fac. Fish., Nagasaki Univ.*, **4**: *1–6*. (in Japanese) (1956)
9. OSTERHOUT, W. J. Befruchtung bei *Batrachospermum*. *Flora*, **87**: *109–115*. (1956)
10. RAO, C. S. P. Acetocarmine as a nuclear stain in Rhodophyceae. *Nature*, **172**: *1197*. (1953)
11. SAIDA, K. Development of the genus *Batrachospermum*. *Bot. Mag. Tokyo*, **1**: *51–53*. (in Japanese) (1887)
12. SIRODOT, S. Les Batrachospermes. Paris. (1884)
13. SVEDELIUS, N. Nuclear phase and alternation in the Rhodophyceae. *Beih. Bot. Centralbl. 1.* **48**: *38–59*. (1931)
14. YAMAHA, G., AND SUEMATSU, S. Karyological investigation of some fresh-water algae by means of nuclear reaction. *Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku. Sect. B*, **60**: *269–277*. (1938)

— Received August 4, 1958 —

PRINTED BY
KOKUSAI BUNKEN INSATSUSHA
SHINJUKU-KU TOKYO

ベニザケのクロルテトラサイクリン処理による各組織への浸透量および加熱によるその破壊度

富山哲夫・米　康夫・小林邦男
（九州大学農学部水産化学教室）

日本水産学会誌
第二十四巻　第十二号　別冊
昭和三十四年四月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 12, April, 1959.

Table 1. Distribution* of CTC in various tissues of CTC (10 ppm)-treated sockeye salmon.

Tissues \ Date of assay / Body size cm. / g.	No treatment			Dip in CTC-sea water			
	#1 VI/18	#2 VI/20	#3 VI/21	#4 VI/18	#5 VI/20	#6 VI/21	#7 XI/20
	45 1350	44 1400	45 1280	46 1400	48 1600	45 1400	49 1600
Unskinned flesh		neg.‡	neg.	0.19	0.28	0.30	
Skin back + tail	0.04	0.01	0.01	2.73	2.31	2.73	1.54+0.50
Skin abdomen	0.03	0.01	0.01	1.68	2.00	1.89	0.88
Flesh back outer†	neg.	neg.	neg.	0.22	0.17	0.32	
Flesh back middle††	0.02	neg.	neg.	0.02	neg.	0.01	
Flesh back inner	neg.	neg.	neg.	0.01	neg.	neg.	
Flesh abdomen	neg.	neg.	neg.	0.11	0.14	0.14	0.27
Flesh tail	0.03	neg.	neg.	0.12	0.05	0.08	0.06
Flesh average**						0.13	0.12
Fin						3.78	§
Vomer						0.92	0.45
Gills						0.76	0.72
Viscera	0.02	neg.	neg.	neg.	0.02	0.01	0.02***

* All values for CTC content are expressed as mcg. of CTC per gram tissue.
** Average of back flesh. § Pectoral fin, 0.15, ventral, 0.88, dorsal, 0.42, caudal, 0.12, and anal, 0.02 mcg/g. † Flesh layer 5 mm. from the skin. †† flesh layer of 5 to 10 mm. from the skin. ‡ less than 0.01 mcg/g. *** stomach. Intestine and others contained 0.01 mcg/g.

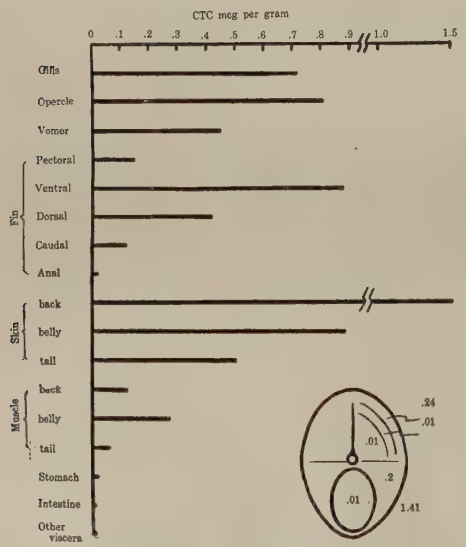


Fig. 1. Distribution of CTC in various tissues of a representative CTC-treated fish (#7 given in Table 1).

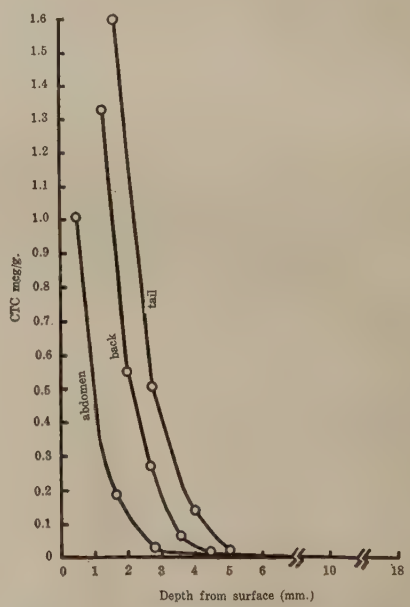


Fig. 2. A representative CTC-penetration pattern in various parts of flesh.

への分布の模様は Table 1 および Fig. 1 に示す通りである。ベニザケの場合も他の魚種の場合[4]と同様に，表皮に多いが，筋肉への浸透範囲は皮下 5 mm 程度以内であることが分つた。更に表皮よりの浸透の模様を細部に亘り測定した結果は Fig. 2 に示す通りであつて，皮下 3～4 mm で急激に減少し，5 mm 以深の肉には 0.01 mcg/g の定量感度では全く検知されなかつた。

魚体各部への分布をみると，Table 1 にみられるように，CTC の濃厚な組織は表皮だけでなく，鰓，鰓蓋，鱗等である。しかし可食部即ち皮付魚肉の CTC 含量は前記組織の含量の 1/3～1/10 程度即ち 0.15～0.3 ppm に過ぎなかつた。また内臓には始んど検出されなかつた。Table 1 に示した試料魚番号 7 は −20°C の冷蔵庫に 5 ヶ月貯蔵したものであつて，この貯蔵期間中に体表面の CTC は多少減少したようにみえるが筋肉中の CTC は殆んど減少していないようである。

CTC で処理してない対照魚では，第 1 回に測定したものの表皮，尾肉及び内臓に痕跡の CTC がみられた。しかしこの場合には解剖台に附着した CTC で汚染した疑いがあつたので，次回からビニールシートで解剖台を毎回蔽うように注意したところ表皮の微量 (0.01 ppm) を除いてはいずれの組織にも CTC は検出されなかつた。

2. 缶詰および料理した場合における皮付筋肉中の CTC の破壊

研究方法の部に記載した方法で缶詰としたものは，Table 2 にみられるように，対照区 6 缶および CTC 処理区 19 缶の内容全部について定量した結果は例外なく皆 negative (0.01 ppm 以下) であつた。

次に Fig. 3 に示すような温度変化条件で水煮した結果は 0.50 ppm のものが 0.01 ppm と減少した。この場合に煮沸水中には CTC は認められなかつたが，紫外線照射によつて Iso-CTC (Isochlortetracycline)

Table 2. Inactivation of CTC in unskinned fillets by canning and cooking.

Cooking			CTC-content		
Method	Temp.	Time (min.)	before†† cooking mcg/g	after cooking (average)* mcg/g	% negative sample
Canning§	10 lbs	70		negative†	100
Boiling	100°C	6	0.50	0.01	0
Broiling	250°C	10	0.38	0.06	0
		15	0.42	0.01	0
Frying	230±5°C	5	0.47	negative	60

* Average of positive samples. † Negative: less than 0.01 mcg/g. § Each can-content of 19 canned treated fish as well a 6 canned untreated fish was subjected separately to the assay.

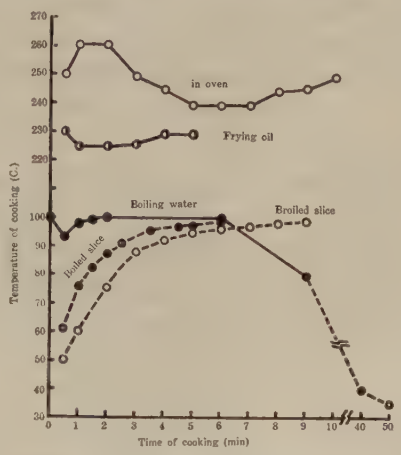


Fig. 3. Change in temperature of fillets and heating medium during cooking.

Table 3. Heat inactivation of CTC in tissues at 95～99°C.

Time of heating	Skin		Muscle§ # 1		Muscle§ # 2	
(min.)	CTC mcg/g	K*	CTC mcg/g	K*	CTC mcg/g	K*
0	1.45		.36		.32	
5	.81		.19		.13	
10	.42	.123	.07	.163	.06	.168
15	.29	.107	.03	.165	.03	.157
20	.20	.099	.02		<.01	
30	.09					

Muscle # 1 reached 95°C. after 5 minutes whereas in the other experiments only after 2 minutes.

§ The muscle sample used was outer layer of back muscle. * Velocity constant for monomolecular reaction.

の存在は確認された。

250°C で 10 分間焙焼する条件では，充分に焼けていないが，0.38 ppm のものが 0.06 ppm と減少した。250°C で 15 分間焙焼した場合には充分に焼けており，0.42 ppm のものが 0.01 ppm と減少した。

230° ± 5°C, で 5 分間フライした場合には，0.47 ppm のものが negative にまで減少した。

3. 筋肉および皮に含まれた CTC の破壊速度

研究方法の項に記載した方法で CTC を含む筋肉および皮を 96～99°C に加熱した場合に，どのような速度で減少するかを検討してみた。その結果は Table 3 および Fig. 4 に示した。加熱分

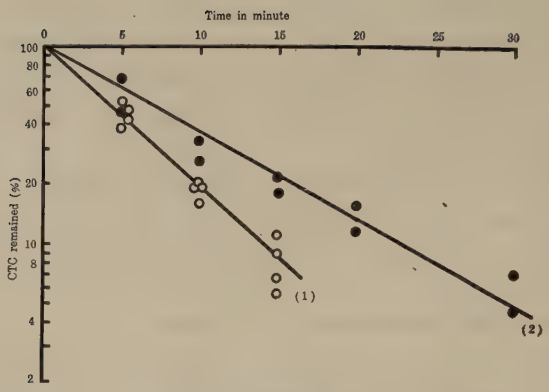


Fig. 4. Rate of inactivation of CTC contained in flesh (1) and skin (2) when heated at 95～99°C.

解反応の初期には試料の温度が充分に上昇していないので加熱後5分後の値に疑問があり，また 20 分以後は残存量が微量となつて定量の誤差が大きいので，5分後の値および20分以後の値を除外すると，Table 3 にみられるように誤差の範囲内で近似した一次反応速度恒数がえられた。

IV. 考　　察

全魚体を CTC 液に浸漬した場合の CTC 浸透量については，富山等[8]，TARR 等[9] および SHEWAN 等[10] の研究がある。いずれも皮の部分に多く，筋肉部には少ないことが明らかにされた。富山等[8a]は鱗で蔽われている状態によつて魚肉への浸透量が異なることを指摘した。本研究の結果も従来の研究結果と略々一致している。ただ鰭や鰓蓋のような硬組織の部分に多いことは興味が多い。恐らくはこれらの硬組織の石灰と CTC とがキレートするために濃厚に沈着するのであろう。紫外線を照射すると，これらの組織の外縁部に CTC の濃厚な沈着がみられた。このことは Ca^{45} および Sr^{90} (Y^{90}) の魚類による吸収代謝の最も活潑な部分と一致するようである[12]。また鰓に多く沈着することも，この組織の石灰代謝の活動性[13]と関係すると思われる。著者等[14]の研究によると，鯉の場合に筋肉への細菌の侵入経路として鰓が重要であることが分つたので，以上のように CTC が鰓に多く沈着することは，鰓から筋肉内への細菌の侵入に1つの障壁をつくることを意味する。恐らくはこのような機構によつて CTC は魚体の鮮度保持に有効に作用するものと信ぜられる。

CTC 液に浸漬処理した場合に，CTC の筋肉内への濃度傾斜を知ることは興味あることである。SHEWAN 等[11]はタラを CTC 氷 (5ppm) で 26 日間保蔵した場合の浸透範囲について報告している。ベニザケについての本研究の結果も SHEWAN 氏等の結果と近似しているが，10ppm の CTC-海水液に浸漬処理した本研究の結果の方が一般に浸透量は少ない。腹肉および尾肉に CTC が多く含まれるのは，いずれも筋肉層が薄いためであることは明らかである。

内臓に痕跡の CTC がみられたが，これは CTC 以外に内臓成分で *Bac. cereus* の発育を阻止する化合物が存在するか，CTC が腹部の外皮を通すか或は鰓を通して浸透したか，いずれかであろう。なおサバの場合には内臓に *Bac. cereus* の発育を阻止する化合物の存在が最近明らかになつた[15]。

本研究の条件で魚体表面に沈着したり魚体内に浸入した CTC 量は，前記のように組織の種類や同一種類の部位等によつて著るしく異なるが，可食部についてみると，平均 0.2ppm 程度に過ぎなかつた。米国で消費されている CTC 処理鶏肉の料理後の残存量を FDA で大規模に調査した報告では，最高 0.39ppm で 0.1ppm 程度残存する場合が多かつた[16]。CTC 処理鶏肉は米国およびカナダを合せて2年半の間に 230,000 トン消費され，また CTC 処理魚肉はカナダで過去約1年間に 4,000 トン消費されたので，消費者は連続に

前記の程度の CTC 残存量を摂取したが，現在までに耐性菌やアレルギーの問題は全く起つていない。また最近の GOLDBERG 等[17]の研究によると，20～40 ppm のストレプトマイシンを含むホウレンソウを兎に与えると，2ケ月以後に 10,000 mcg/cc に耐性の菌が 5～40% も出現したが，20～40 ppm の CTC を含むホウレンソウを与えると，投与後7ケ月間に 500 mcg/cc に耐性のものは 5% 以下に過ぎなかつたし，また投与期間中に耐性菌の出現割合の増加する傾向はみられなかつた。また MC VAY 等[18]が数十人の患者に毎日 250 mg CTC を2回経口投与し，21ケ月経続しても腸内菌叢には対照群のものとの間に差は認められなかつたし，また *Candida albicans* の出現頻度も対照群と同一であつた。更に少量の CTC の連続摂取によつてアレルギーが現われるかも知れないとする可能性は，最近の次のような研究によつて否定された。即ち CTC にアレルギーとみられる者が全米に7名しか見出されなかつたが，これらに 0.5, 1.0, 5.0 および 25.0 mg の CTC を FDA の抗生物質部長 WELCH の管理の下に毎日経口摂取させたところ，アレルギー症状は全く認められなかつたと報告されている[16]。以上のような経験および研究の資料に基いて，本研究の条件でみられた可食部の CTC 量を検討してみると，そのまま生食したとしても耐性菌の出現やアレルギーの発現するようなことは全くありえない。

サケ類では実際に生食されることは殆んどなく，加熱加工或は塩蔵されるので，可食部の CTC 量は更に減少する。魚肉および皮に含まれる CTC が加熱によつて破壊する速度については，既に TARR 等[5),9)]，ALBERTSEN[10]，富田等[8a)]の研究があるが，これらの研究では定量法の感度が低かつたために，CTC の高い濃度範囲で研究されている。本研究に用いた定量法の感度は 0.01 ppm であるから，一般に可食部にみられる CTC 浸透量 0.4～0.05 ppm の範囲に亘つて加熱による減少速度を精密に追跡することが容易にできた。この破壊速度が一次反応に従うことは，一定の速度恒数値が計算されたことから疑う余地はない。興味の多いことは皮に含まれた CTC の熱安定性と筋肉中に含まれる CTC のそれとの間に顕著な差が認められた点である。この機構については目下研究中である。

CTC を含む可食部を缶詰とした場合には，negative (0.01 ppm 以下) にまで減少したことは従来の研究[3),6)]と一致している。また CTC を含む可食部を水煮，焙焼およびフライとした場合の CTC の減少も，底引魚類についての研究結果[8b,c)]と一致し，原料の CTC 含量の 1/6～1/50 に減少した。加熱破壊した場合の生産物は Iso-CTC であつて，このものは抗菌作用もなく，最近の研究では白鼠に長期投与してもその各組織に病理学的変化を全く与えないことが明らかになつたので[19]，CTC 含有食品で加熱したものは食品衛生上問題とならないといえる。塩蔵の場合の CTC の減少については次報に詳細報告するが，サバの場合と同様に塩蔵品の貯蔵中に大部分の CTC は破壊することが分つた。

以上の論議で明らかなように，ベニザケの鮮度保持の目的で少なくとも 10 ppm の CTC を含む海水に 30 分間浸漬することは，食品衛生上の立場から許容して差支えないといえる。

V. 総　　括

北洋の流刺網により獲つたベニザケをサケ工船上で，10 ppm の CTC を含む海水中に 30 分間浸漬処理をした場合，CTC の各組織への分布および筋肉中への浸透範囲を定量した結果および組織中の CTC の加熱破壊速度を研究した結果は次の通りである。

1. CTC は表皮だけでなく，鰓，鰓蓋および鰭に比較的濃厚に含まれた。
2. 背部の筋肉内への浸透範囲は皮下 3～4 mm までであつた。
3. 皮および筋肉に含まれた CTC の 96～99°C における加熱破壊は一次反応に従う。皮の CTC は筋肉のものより加熱破壊に対し安定であつた。
4. 可食部に含まれた CTC は缶詰加工により完全に破壊され，また水煮，焙焼或いはフライとした場合にも 0.06 ppm 以下に減少した。
5. 低濃度の CTC の連続投与による耐性菌やアレルギーの発現の可能性に関する最近の研究を基礎として本研究でみられた浸透量が食品衛生上安全なものであることにつき論議した。

終りに本研究の試料の調製に協力された日本水産株式会社並びに研究に援助をえた日本レダリー株式会社に深謝の意を表する。CTC の生物検定に助力された北原慶子，大山重信，森健児，豊田恭平および岩崎富生の諸氏に感謝を捧げ擱筆する。

文　献

1) Gillespie, D. C., Boyd, J. W., Bissett, H. M., and Tarr, H. L. A.: *Food Technol.*, **9**, 296 (1955).
2) Firman, M. C., Abbey, A., Darken, M. A., Kohler, A. R. and Upham, S. D.: *Food Technol.*, **10**, 381 (1956).
3) Stern, J. A., Liebman, H. L., Munkelt, R. E., and Hatherell, B.: *Antibiotics Annual*, 1956～1957, 975 (1957), Med. Encyclopedia, Inc., New York, N. Y. Stern, J. A., Liebman, H. L., Kudo, G., Chapel, J., Olsen, R. A., Farber, L. L. and Grennan, M.: *Food Technol.*, **12**, 132 (1948).
4) 富山哲夫・野村　稔・黒木俊一：本誌，**21**，262 (1955)．富山哲夫・黒木俊一・野村　稔：本誌，**21**，958 (1955)．富山哲夫・黒木俊一・前田伝喜・浜田盛治・本田　彰：本誌，**22**．120 (1956)．富山哲夫・米　康夫・黒木俊一・野村　稔・原昭太郎・七字　徹・前田敏弘・小田一郎・松尾俊朗：本誌，**22**，128 (1956)．
5) Tarr, H. L. A., Boyd, J. W., and Bissett, H. W.: *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 372 (1954).
6) 宇野　勉・大島　浩・笠島正秋・徳永俊夫・相沢　悟・中村全良：北海道区水産研究所報告，**19**，37 (1958)．
7) 富山哲夫・米　康夫・小林邦男：本誌，**24**，937 (1959)．
8) a) 富山哲夫・米　康夫・三ケ尻和男：本誌，**22**，778 (1957)．　b) 富山哲夫・米　康夫・津田　厚：本誌，**23**，568 (1958)．c) 富山哲夫・米　康夫・津田　厚：本誌，**23**，572 (1958)．
9) Tarr, H. L. A.: Proceedings, First International Conference on the Use of Antibiotics in Agriculture, p. 203～204, 1956. Publication No. 397, Natl. Acad. Sciences—Natl. Res. Council, Wash. 25, D. C.
10) Albertsen, B.: *Industrial Refrigeration*, **131**, 19 (1956).
11) Shewan, J. M.: Proceedings of Fish Processing Technologist Meeting in Rotterdam, 25～29, June (1956).
12) Tomiyama, T., Kobayashi, K. and Ishio, K.: Research in the effects and influence of the nuclear bomb test explosions. Vol. II, p. 1163, p. 1181, p. 1189, published by Japan Society for the Promotion of Science, Ueno, Tokyo, 1956.
13) Tomiyama, T,, Ishio, S., and Kobayashi, K.: Ditto, p. 1151.
14) 富山哲夫・米　康夫・豊田恭平：1958 年 10 月，日本水産学会秋季大会（新潟市）において発表．
15) 富山哲夫・米　康夫：1959 年 4 月，日本水産学会年会（東京都）において発表．
16) Welch, H.: Private communication.
17) Goldberg, H. S., Goodman, R. N. and Lanning, B.: In press in *Antibiotics Annual*, 1958～1959.
18) Mc Vay, L. V., Jr., and Sprunt, D. H.: *Arch. Inst. Med.*, **92**, 833 (1953).
19) Research Division, American Cyanamid Co: Private communication.

種々のクロルテトラサイクリン(CTC)処理方法による底引漁獲物の鮮度保持効果および各処理魚体内の CTC 分布

米　康夫・富山哲夫・浜田七郎

日本水産学会誌
第二十五巻 第二号 別冊
昭和三十四年六月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 2, June, 1959.

種々のクロルテトラサイクリン(CTC)処理方法による底引漁獲物の鮮度保持効果および各処理魚体内の CTC 分布*

米　康夫・富山哲夫・浜田七郎

(1959 年 5 月 4 日受理)

COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF VARIOUS CHLORTETRACYCLINE (CTC)-TREATMENTS IN KEEPING QUALITY OF TRAWLED FISH AND CTC RESIDUE ON TREATED FISH

Yasuo Yone, Tetuo Tomiyama** and Shichiro Hamada***

Immediately after being caught butter fish and lizard fish were subjected to various CTC-treatments aboard a bull trawler, "Akashimaru No. 96", and stored in plain or CTC ice in a fish hold of the boat for 16 to 19 days. The CTC treatments employed were (1) CTC-icing (4.5 ppm CTC), (2) two-minute dip in sea water solution of CTC and (3) showering a 25-kg lot of fish with a one liter aliquot of the solution. The volatile bases nitrogen (VBN) and CTC residue were determined after landing by the microdiffusion method[5] and the cylinder plate assay method[4], respectively.

The butter fish stored in plain ice without prior CTC treatment showed incipient spoilage, whereas those held in CTC-ice were judged to keep a passable quality. The quality of the fish stored in CTC-ice was better than that of spray-treated fish and comparable with that of dip-treated in a 10 ppm CTC solution. In dip-treated group, the fish quality was fairly improved with the increase in the CTC concentration.

The CTC residue was found about 0.1 ppm in the flesh of butter fish when sprayed with a 80 ppm CTC solution, dipped in a 40 ppm CTC solution and/or CTC-iced. The CTC residue was highest right under the skin, decreased sharply with the depth of flesh, and not existed in deeper part than a 5-mm distance from the skin.

In case of lizard fish, the effectiveness of the CTC treatment was not so marked. The CTC residue in this fish was far smaller than that in butter fish though the vertical distribution pattern of CTC in the flesh was similar each other.

Under the present experimental condition, the CTC residue varied linearly with the CTC concentration of the solution for the dip or spray treatment, and logarithm of the residue in the flesh showed a linear relationship with logarithm of VBN of the flesh. These relationships suggest that passable quality (VBN, 25 mg%) of any fish comparable to butter fish in size and shape will be resulted from keeping CTC residue at a 0.1 ppm level which can be achieved by such treatment aboard the boat as a dip in 20 to 40 ppm CTC solution or a spray with solution of CTC concentration higher than 80 ppm.

富山等[1]は 1956 年に底引漁獲物を船上でクロルテトラサイクリン (CTC と略記) 液に浸漬するか, CTC 氷によつて氷蔵するか或は浸漬後 CTC 氷で保蔵すると, 良い鮮度が保持できることを報告した。篠山等[2]もキグチ, ニベおよびタチウオを船上で CTC 浸漬処理すると, ニトロフラゾンに浸漬処理した場合よりも優れた鮮度保持がえられたと報告している。しかし同一魚種について CTC の種々の濃度の液を用い, 種々

* 本研究の概要は 1959 年 4 月 3 日の日本水産学会年会 (東京都) において発表した。

** 九州大学水産化学教室 (Fish. Chem. Lab., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan.)

*** 西海区水産研究所 (Seikai Reg. Fish. Res. Lab., Nagasaki, Japan.)

の CTC 処理方法を適用した場合の保鮮効果の比較および保鮮効果と CTC 滲透量との関係について研究した報告はない。

CTC 氷および CTC 液で魚体を外部から処理する場合には各種の方法が考えられる。CTC 氷の場合にはこれを直接に魚体の上に載せる方法および魚体との間にパーチメント紙を置く方法がある。魚体を CTC 液で処理する場合にも船上の処理能率を考慮に入れると，短時間浸漬処理法および散布法が考えられる。

これらの方法で魚体表面に附着する液が一定量であれば，用いる液の濃度によつて保鮮効果は著るしく影響される筈である。他方，液の濃度を高めると，処理後に CTC の肉への滲透量が増大する筈であるから，その滲透量について検討する必要がある。

本研究は以上の点を解明するために行つたものであつて，著者の一人（浜田）が手繰船に乗船し，実際の漁獲操業条件で種々の CTC 処理方法を実施し，氷蔵条件は一般の手繰船のものと同一にして帰港し，陸揚げ後に肉の鮮度および CTC 含量を求めた。その結果では従来報告されていない二，三の事実を明かにしたので以下に報告する。

研究材料および方法

1. 研究材料: 1958 年 11 月 19 日より 11 月 21 日までの間に第 96 および第 97 明石丸（大洋漁業 KK 所属）が東支那海の農林漁区 543, 532 および 522 において，底引網で漁獲したイボダイ（*Psenopsis anomala*; 体長 11～16 cm, 体重 90～110 g）およびワニエソ（*Saurida tumbil*; 体長 40～50 cm, 体重 800～1500g）を供試した。

漁獲物の処理に使用した CTC は医薬用 CTC 塩酸塩結晶である。CTC 氷は日本レグリーの指示方法[3]により製造した 4.5 ppm CTC 含有氷であり，浸漬および散布処理にはアクロナイズ FD (CTC 10% + クエン酸 10% + 食塩 80%) の海水溶液を使用した。

2. CTC 処理方法: 漁獲直後水洗し，第 96 明石丸船上で，10, 20, 40 および 80 ppm の CTC-海水液の 30 *l* に，籠にいれた約 50 kg（2 箱分）の供試魚を 2 分間浸漬し，次に常法のように箱建した浸漬区をつくつた。また水洗し箱建後，前記の CTC 濃度をもつた海水液を 1 箱に対し 1 *l* の割合でジョロで散布した散布区を設けた。なお 1 網の漁獲物中に同一魚種の尾数が少かつたので，イボダイでは全試験区を充すのに 11 月 19 日，20 日および 21 日の漁獲物を用い，1 区当り 1 箱づつを作つた。従つて試験区に用いたと同じ条件の漁獲物で必ず無処理の対照区を毎回作るように注意した。

各試験区の魚箱はパーチメント紙或はポリエチレン膜で覆い，魚艙内で 5 ppm の CTC を含む氷或は白氷中に貯蔵した。魚の被覆用にパーチメント紙とポリエチレン膜を用いたのは，前者では氷の融解水が多少通過し，後者では全く通過しないので，外観および保鮮効果に多少の差があるかと考えたからである。試験区の各魚箱を艙内に収納する場合には，先ず魚艙内を魚箱やシートで縦に 2 分し，左舷側に白氷を，右舷側に CTC 氷を置かるよう注意し，また試験試料は魚艙内の両舷側，上層および下層を避けて中央部附近に貯蔵した。

漁獲物は 12 月 6 日に陸揚げし，氷およびパーチメント或はポリエチレン膜を取去り，新らしいポリエチレン膜と白氷とを順次に載せ，−2～0°C の室に貯蔵し，12 月 7 日より 10 日迄の間に CTC の残存量並びに揮発性塩基の定量を行つた。従つて供試魚は漁獲よりこれらの定量迄 18～19 日の間それぞれ氷蔵されたことになる。

3. CTC および揮発性塩基窒素（VBN）の定量: 各試験区の魚箱の上部から任意に 1 区当り 20 尾のイボダイを，また 1 区当り 4 尾のワニエソを抽出して試料とした。また魚箱の上下により CTC の浸透量に差があるか否かを知るために，CTC 液を散布しポリエチレンで被覆し白氷で貯蔵した試験区の魚箱の下部からも任意に同数の魚を抽出供試した。

これらの供試魚は軽く水洗し，内臓を除去し，三枚におろした後に腹部を除き，次に皮と肉とに分けて，皮は包丁で，肉はミックサーで細砕し，それぞれ定量に供した。CTC の定量には富山・小林・米の簡易 cylinder plate 法[4]を用いた。CTC の滲透模様を知るためには，7 尾のイボダイおよび 4 尾のワニエソの凍結組織をそれぞれカンナで薄層に切り，各切片について定量した。この場合には試料がイボダイでは 5.2～7.3g，エソでは 6.6～9.7 g であつたので，ミクロブレンダーを用いて混和抽出した。VBN の定量は Conway の微量拡散法[5]により行つた。即ち 10g の肉糜に 30cc の 5% 三塩化酢酸を混和して除蛋白し，

その沪液を定量に供した。

研究結果

1. CTC 処理イボダイおよびワニエソの鮮度

研究方法の部に記載した方法で漁獲直後のイボダイおよびワニエソを船上で処理し，魚艙中に白氷或は CTC 氷で氷蔵して帰港したものの鮮度を官能検査および VBN によつて判断した結果は，Table 1 および 2 に示す通りである。これらの表から明かなことは，イボダイにおいては白氷で保蔵した対照区はいづれも腐敗していたが，処理区は 10 ppm および 20 ppm CTC 散布-白氷貯蔵区を除いては効果が認められた。特に浸漬区は CTC の 20 ppm 以上に浸漬したものが良好であり，散布区は 80 ppm を用いたものが比較的によかつた。注目すべきことは，20 ppm CTC 以上の濃度に浸漬した場合には CTC 氷との組合せは無効であつたが，10 および 20 ppm CTC 液を散布した

Table 1. Organoleptic phases[1] of round fish in various experimental groups

Fish species / Date of catch			Butter fish* XI/19	Butter fish* XI/21	Butter fish* XI/21	Butter fish* XI/20	Lizard fish** XI/18	Lizard fish** XI/18
Treatments \ CTC conc. (ppm) for dip or spray			10	20	40	80	20	40
Control	plain ice	parchment	IV	III	III–IV	IV	IIa	
		polyethylene	IV	III–IV	III	III–IV	IIa	
	CTC ice	none	III–IV	IIb	IIb	IIb		
Dip	plain ice	parchment	IIb–III	IIb	IIa	IIa–IIb	IIa	Ib–IIa
	CTC ice	none	IIb	IIb	Ib–IIa	IIb–III	Ib–IIa	Ib–IIa
Spray	plain ice	parchment	III	IIb–III	IIa–IIb	IIa–IIb	IIa	Ib–IIa
		polyethylene	III–IV	III–IV	IIb–III	IIb–III	Ib–IIa	Ib–IIa
	CTC ice	parchment	III	III	III	IIb	IIa	IIa
		none	III–IV	IIb	IIb	IIb	IIa	IIa

* *Psenopsis anomala* ("ibodai"). ** *Saurida tumbil* ("wanieso").

1: The organoleptic phases herein presented are principally those for haddock according to Reay-Shewan[6]. Ib: Eyes not sunken, lost brilliancy. Gills red, stale odor. Surface brilliant. Flesh noticeably soft. Odor neutral. IIa: Eyes slightly sunken, opalescent. Gills red, putrid odor. Surface slightly slimy. Flesh softer. Odor "strengthening" but not stale. IIb: General appearance stale. Eyes sunken. Gills red, putrid odor. Surface slimy. Flesh soft. Odor stale. III: Eyes opalescent, sunken. Gills pale red, putrid odor. Surface very slimy. Flesh very soft. Odor bad odor. IV: Eyes deeply sunken, sometimes hemorrhagic. Gills grey, putrid odor. Surface very soft, very slimy. Flesh very soft. Odor putrid.

Table 2. Volatile bases nitrogen content (mg%) of muscle of fish in various experimental groups

Fish species / Date of catch			Butter fish* XI/19	Butter fish* XI/21	Butter fish* XI/21	Butter fish* XI/20	Lizard fish** XI/18	Lizard fish** XI/18
Treatments \ CTC conc. (ppm) for dip or spray			10	20	40	80	20	40
Control	plain ice	parchment	44.8	40.1	37.1	45.5	38.1	
		polyethylene	38.0	59.5	37.7	37.4	36.1	
	CTC ice	none	32.1	28.7	31.3	36.8		
Dip	plain ice	parchment	36.0	31.1	20.1	21.7	31.0	32.7
	CTC ice	none	28.1	26.1	19.7	24.9	26.7	27.4
Spray	plain ice	parchment	42.2	34.0	27.7	28.0	30.1	30.1
		polyethylene	49.4	41.2	30.1	30.8	26.3	29.4
	CTC ice	parchment	30.8	32.9	30.4	25.4	30.0	27.6
		none	33.6	23.7	30.7	30.8	25.5	34.1

*) **) See Table 1.

場合にはこの組合せは有効であつた。これに対しワニエソでは対照区も比較的によい鮮度を示し，CTC 浸漬および CTC 散布の効果は僅かであつた。なお白氷氷蔵の場合，パーチメント紙被覆とポリエチレン膜被膜との間には鮮度の差は認められなかつた。

2. イボダイおよびワニエソの肉および皮における CTC 残存量

肉における CTC 残存量は Table 3 に，鱗を含む皮における CTC 残存量は Table 4 に示してある。イボダイの肉の場合には CTC 氷氷蔵のみでは残存量 0.04 ppm であり，散布では CTC 濃度が 40 ppm においても残存量は平均 0.03 ppm に過ぎなかつた。これに対し浸漬区においては 10 ppm の CTC 浸漬では残存量が 0.04 ppm であつたが，浸漬液の CTC 濃度の増加と共に残存量が増加した。皮においては多少異り，CTC 氷氷蔵のみでは平均 0.30 ppm，10 ppm CTC 浸漬のみでは 0.17 ppm，散布では CTC 濃度が 40 ppm であつても 0.11 ppm であつた。散布の場合に魚箱の上部と下部とで肉への CTC の滲透量にどの程度の差があるかをみた結果は Table 5 に示すように，僅かの差異しか認められなかつた。また上下の鮮度差も高濃度の CTC の場合に僅かに認められる程

Table 3. CTC residue in flesh of bottom fish

Fish species / Date of catch			Butter fish "ibodai" XI/19	XI/21	XI/21	XI/20	Lizard fish "wanieso" XI/18	XI/18
Treatments \ CTC conc. (ppm) for dip or spray			10	20	40	80	20	40
Control	plain ice	parchment	neg.*	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
		polyethylene	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CTC ice	——	0.04	0.04	0.03	0.04	neg.	neg.
Dip	plain ice	parchment	0.04	0.10	0.15	0.36	0.01	0.03
	CTC ice	——	0.04	0.08	0.16	0.39	neg.	0.04
Spray	plain ice	parchment	0.01	0.03	0.02	0.11	neg.	neg.
		polyethylene	neg.	neg.	0.04	0.06	neg.	neg.
	CTC ice	parchment	0.03	0.02	0.03	0.07	neg.	neg.
		——	0.07	0.07	0.04	0.04	neg.	neg.

* neg. means smaller than 0.01 mcg per g. tissue.

Table 4. CTC residue on skin of bottom fish

Fish species / Date of catch			Butter fish "ibodai" XI/19	XI/21	XI/21	XI/20	Lizard fish "wanieso" XI/18	XI/18
Treatments \ CTC conc. (ppm) for dip or spray			10	20	40	80	20	40
Control	plain ice	parchment	0.06	0.02	0.01	0.01	neg.	neg.
		polyethylene	neg*.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CTC ice	——	0.30	0.21	—	0.39	—	—
Dip	plain ice	parchment	0.17	0.39	0.58	1.21	0.10	0.14
	CTC ice	——	0.23	0.36	0.66	1.24	0.10	0.22
Spray	plain ice	parchment	0.06	0.11	0.10	0.19	0.05	0.11
		polyethylene	0.04	0.04	0.11	0.15	0.02	0.07
	CTC ice	parchment	0.17	0.12	0.18	0.39	neg.	—
		——	0.40	0.53	0.22	0.19	0.07	0.12

* neg. means smaller than 0.01 mcg per g. tissue.

Table 5. Change in CTC content of fish* with position of fish container

Spec. of fish	mcg per cc. of CTC-sea water used for spraying	position of fish box	CTC content, mcg/g flesh	skin	VBN mg%	Organoleptic phase
Butter fish	10	upper	neg.	0.03	32.7	III
		bottom	neg.	0.05	35.4	III
	80	upper	0.06	0.19	26.4	IIa
		bottom	0.06	0.15	27.4	IIb
Lizard fish	20	upper	neg.	0.04	29.4	IIa
		bottom	neg.	neg.	30.1	IIa
	40	upper	neg.	0.10	23.7	Ib–IIa
		bottom	neg.	0.09	25.4	IIb

* Fish were covered with polyethylene film after being sprayed, and then stored under plain ice.

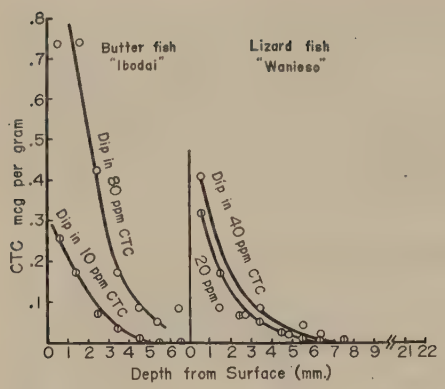


Fig. 1. Distribution of CTC in muscle of dipped fish.

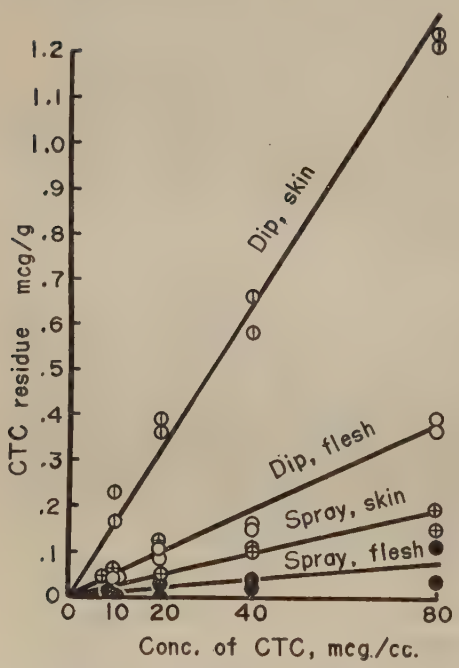


Fig. 2. Relationship between CTC residue in skin and flesh of butter fish and CTC concentration employed for dip or spray.

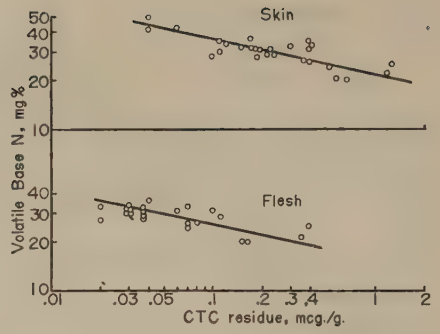


Fig. 3. Relationship between CTC residue in skin and flesh and volatile bases nitrogen content of muscle of dipped butter fish.

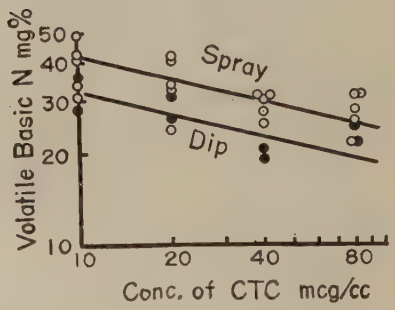


Fig. 4. Relationship between CTC concentration of CTC-sea water employed and volatile bases nitrogen content of muscle of dipped butter fish.

度であつた。他方，ワニエソの肉の場合には浸漬区に 0.01～0.04 ppm が認められただけで，他の試験区のものは，いづれも検定限界の 0.01 ppm 以下であつた。

これらの肉中の残存量が肉の部位にどのように分布するかをみた結果は Fig. 1 に示すように，10 ppm に浸漬したイボダイは皮下 5 mm より深部へは全く浸透していなかつたが，80 ppm に浸漬したものは浸透量も多く範囲も深かつた。これに反しワニエソの 20 ppm 浸漬区は 40 ppm 浸漬区と浸透範囲に殆んど差なく，イボダイの 10 ppm 浸漬区と近似した浸透図を示し，皮下 6 mm 以深へは浸透が認められなかつた。

3. 処理液の CTC 濃度と組織中の CTC 残存量との関係，並に CTC 残存量と肉の VBN との関係

浸漬液および散布液の CTC 濃度とイボダイの肉および皮における CTC 残存量との関係は，Fig. 2 に示すように明かに直線関係が認められる。また肉および皮における CTC 残存量と肉の VBN との関係は，Fig. 3 にみられるように，双方の対数値の間に略々直線関係が成立し，従つて処理液の CTC 濃度の対数値と肉の VBN の対数値との間にも直線関係が成立する (Fig. 4)。

考　　察

底引漁獲物を船上で CTC 液に浸漬処理或は CTC 氷で氷蔵することが鮮度に有効なこと，また CTC 処理漁獲物の肉中の CTC 残存量は 0.1 ppm 程度であることについては富山等の報告[1,7]がある。しかし昭和32年の厚生省告示で許可された CTC 氷による処理以外に，浸漬および散布処理が許可されるためには，有効で実用的な処理方法を探求するだけでなく，種々の処理方法を施した場合における魚肉中の CTC 残存量に関する資料を必要とする。

本研究ではイボダイを用い，浸漬法，散布法，氷蔵法およびそれらの組合せの保鮮効果を比較した。その結果は浸漬法が最も優れているが，10 ppm の CTC 液浸漬では CTC 氷氷蔵法と近似の効果に過ぎず，少くとも 20～40 ppm の CTC 液を使用すべきことが分つた。これに対し散布法は効果が劣り，40 ppm 以下の CTC 液では効果が少く，ただ CTC 氷と併用した時のみ有効であつたことは注目すべきである。このように散布法が浸漬法に劣ることは，魚体の背部を上にして CTC 液を散布する方法では，腐敗菌の侵入場所として重要な鰓が CTC 液に触れ難いためであろう。

CTC が比較的浸透し易いと思われるイボダイの肉中の CTC 残存量をみると，CTC 氷氷蔵，80 ppm の CTC 液散布および 40 ppm CTC 液浸漬処理では，いづれも 0.03～0.15 ppm 程度であつた。この量は米国およびカナダで既に2年以上市販されている CTC 処理鶏肉の料理後における CTC の残存量程度であるから，この程度のものは生食されても差支えない。従つて船上での CTC 処理には氷蔵のみでなく，浸漬法および散布法も実用されてよいといえる。

皮中の CTC 残存量は肉のそれの 3～6 倍であつた。皮から肉への CTC 浸透残存の模様をみると，両魚種とも皮から 5 mm 迄の間で内部に向つて急傾斜に減少している。イボダイとワニエソとを比較すると，40 ppm および 20 ppm の CTC 液に浸漬したワニエソの CTC 滲透図と 10 ppm に浸漬したイボダイの CTC 滲透図が近似しているので，エソではイボダイに比べて CTC が皮を通過し難いものと推察される。

イボダイの場合には処理方法の如何を問わず CTC 残存量の対数値と肉の VBN の対数値との間に直線関係が認められたので，Fig. 3 から求めると，肉の VBN が 25 mg% でよい鮮度が保たれるためには，CTC 残存量は少くとも 0.1 ppm を含まねばならない。他方 Fig. 2 から明かなように，0.1 ppm の CTC が肉中に残存するためには，2分間浸漬処理のの場合には 20 ppm の CTC 液，散布の場合には 80 ppm 以上の濃度の液を用いねばならない。勿論これらの値は魚体の大小，表皮の厚薄，鱗の大きさや被覆等の条件で変化するであろうが，魚体が小さく，小鱗で覆われた魚種についての一つの代表的資料といえよう。

これに対してワニエソのように鱗も大きく，魚体或は肉層の厚い魚種では明かにこの関係が成立しない。Fig. 1 にみられるように，この場合にも CTC は皮から 6 mm までの筋肉内へ滲透しているにも関らず，全魚肉の CTC 含量は 0.01 ppm 程度の微量であつた。これは明かに 6 mm までの CTC を含む肉層が CTC を含まない約 16 mm の肉層で稀釈されていることに原因していることは，Fig. 1 の滲透図から全肉中の CTC 量を計算すると 0.016 ppm となることから裏づけされる。また比較的大形のワニエソでは CTC の侵入が表皮に近い部分のみであるから，長期間保蔵の場合に内臓からの変敗を防止しえない。従つて CTC 処理の効果が判然としない一つの原因と思われる。大形或は筋肉の厚い魚では内臓を除去してから CTC 処理すべきである。

本研究でえられた保鮮効果および CTC 残存量の結果から綜合的に考えると，イボダイと類似の魚種の場合，船上での実用的処理方法としては，40 ppm の CTC 液に短時間浸漬するか，或は腹部を上にして箱建てしてから，80～100 ppm の CTC 液を1箱に対し 1*l* 以上をジョロで散布した後，パーチメント紙で覆い，もし保蔵期間が 15 日以上に亘るものは CTC 氷で保蔵するのが最もよいといえる。

総　　括

大洋漁業所属第 96 明石丸船上において CTC 処理の各種方法を適用した場合の保鮮効果の比較および陸

揚げ後における処理魚の CTC 残存量について研究し，次のような結果をえた。

1. CTC 氷 (4.5 ppm) で魚艙に 16～19 日氷蔵した後の鮮度は白氷区よりも優れていた。白氷区は陸揚げ当時既に殆んど初期腐敗の段階にあつた。

2. CTC 10 ppm の液に浸漬した場合および 10 或は 20 ppm の液を撒布した場合には，CTC 氷の併用によつて保鮮効果が高まつた。

3. 浸漬および撒布の場合には液の CTC 濃度の増加と共に保鮮効果は良好となつた。

4. イボダイの肉における CTC 残存量は濃度 80 ppm の液に浸漬した場合を除くと，いずれの処理方法によつても 0.1 ppm 附近或はそれ以下であつて，生食しても差支えない量であつた。

5. ワニエソの場合には 40 ppm の濃度の CTC 液に浸漬した場合でさえ 0.03 ppm に過ぎず，氷蔵法および撒布法で処理した場合は検知できない量 (< 0.01 ppm) であつた。

6. CTC の筋肉への滲透はイボダイおよびワニエソいずれの場合にも皮下 6 mm 迄の肉層であり，濃度は内部に向つて急傾斜に減少していた。

7. 肉或は皮の CTC 残存量の対数値と肉の VBN の対数値とは直線関係を示す。この関係からみると，よい鮮度を保つためには肉に少くとも 0.1 ppm の CTC が含まれねばならない。イボダイの場合，肉に 0.1 ppm を含ませるためには，浸漬液の濃度は 20～40 ppm，撒布液の濃度は少くとも 80 ppm とせねばならない。

本研究は日本レダリー KK の支援の下に実施され，また大洋漁業 KK 長崎支社高峰漁業課長および第 96 明石丸乗組員各位の協力をえた。研究の遂行には西海区水研の山田紀作博士，篠山茂行技官，長崎水試藤田場長の理解ある援助と当教室の小林邦男，森　健児，豊田恭平，岩崎富生氏等の助力を仰いだ。ここにそれぞれ深謝の意を表する。

文　　献

1) 富山哲夫・米　康夫・黒木俊一・野村　稔・原　昭太郎・七字　徹・前田敏弘・小田一郎・松尾俊朗: 本誌, **22**, 128 (1956).
2) 篠山茂行・浜田七郎・江平重男・山田紀作: 西海区水産研究所研究報告, 12 号, 21 頁 (1957).
3) 日本レダリー KK: アクロナイズ・ニュース No. 2 (1957).
4) 富山哲夫・小林邦男・米　康夫: 本誌, **24**, 937 (1959).
5) CONWAY, E. J.: "Micro-diffusion analysis and volumetric error", Crosby Lockwood and Son, Ltd., London (1939), pp. 75～81.
6) REAY, G. A., and SHEWAN, J. M.: "The spoilage of fish and its preservation by chilling". Advances in Food Research, Vol. 2, p. 343 (1949), Academic Press Inc., New York, N. Y.
7) 富山哲夫・米　康夫・津田　厚: 本誌, **23**, 568, 572 (1958).

船上におけるサバの鮮度保持に対するクロルテトラサイクリン(CTC)水氷浸漬の効果およびCTCの残存量

富山哲夫・米康夫

日本水産学会誌
第二十五巻 第四号 別冊
昭和三十四年八月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 4, August 1959.

船上におけるサバの鮮度保持に対するクロルテトラサイクリン (CTC) 水氷浸漬の効果および CTC の残存量*

富山哲夫・米　康夫

(1959 年 5 月 4 日受理)

EFFECTIVENESS OF DIP IN ICED CHLORTETRACYCLINE (CTC)-CONTAINING SEA WATER ON KEEPING QUALITY OF MACKEREL ABOARD SHIP AND DETERMINATION OF CTC RESIDUE ON THE FISH

Tetuo Tomiyama and Yasuo Yone**

Mackerels were placed immediately after being angled in fish hold which contained regular ice and chlortetracycline (CTC)-containing sea water and kept for 6 to 7 days. Freshness and CTC-residue were estimated after landing. Further, a storage experiment at 3~7°C. was carried out in a store room of ice plant.

When mackerels were held in about 3 ppm CTC-sea water, the CTC residues in the muscle and the skin were found only 0.05 ppm and 0.8 ppm, respectively. When held in about 6ppm CTC-sea water, the residues in the muscle and the skin were found 0.09 ppm and 1.25 ppm, respectively. The distribution pattern of CTC in the muscle showed a sharp decrease in the residue within a 5-mm depth, and no CTC were found in the muscle deeper than 9 mm.

When mackerels were stored at 3~7°C. after landing, the storage life of both the CTC-treated groups was 7 days as compared with 5 days for the control group. It is of interest that the formation of histamine in the muscle during the storage was greatly inhibited when the fish were dip-treated aboard ship.

東支那海には大型のサバハネ釣漁船が多数操業し，昭和 32 年の統計では 69 隻におよび，漁獲量ではわが国のハネ釣総漁獲高 2513 万貫の約 1/3 はこの海区で漁獲されている。漁船は概ね 100 トン以上，操業期間も約 7 日間にわたるものが多いので，漁獲物の鮮度保持には腐心している。どの漁船もサバを水氷に浸漬して帰港するが，保蔵中に腹割れで内臓や血液が魚艙に流れ出すので，帰港時には水氷はすでに腐臭を発しているのが常である。このような取扱いであるから，鮮度は低下し，サバによる食中毒の危険が多いのも当然である。

水氷中にクロルテトラサイクリン (CTC と略記) を加えて保鮮効果を高める企ては，1955 年富山等[1]によつて漁獲直後のウルメイワシに試みられた。その結果によると，この処理イワシを低温に保蔵した場合，揮発性塩基窒素の増加が遅れるだけでなく，ヒスタミンの生成も少いことが分つた。本研究は水氷中に CTC を少量添加したものにサバを保蔵した場合に，どの程度の保鮮効果があるか，サバ肉中のヒスタミンの生成がどの程度抑制されるか，また肉中の CTC 残存量はどの程度かを知る目的で実施したものである。その結果では肉中のヒスタミン生成の抑制がみられ，予期通り保鮮に優れた効果がえられたので，漁獲物を船上で水氷に保蔵するサンマ，イカ等の他の漁業にもこの結果はよい参考になるであろう。

---

* 本研究の大要は 1959 年 4 月 3 日の日本水産学会年会（東京都）において発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ.).

研究材料および方法

1. 研究材料

第6朝日丸（三崎漁業協同組合所属）が東支那海（27°45′N, 123°40′E）において，1958年11月2日および3日にハネ釣法で漁獲した体長約 30cm，体重 380～540g のものを試験に供した。

浸漬用の CTC 製剤は CTC 10%，クエン酸 10%，および食塩 80% の混合物である。

2. 船上における CTC 処理

右舷の二つの魚艙にそれぞれ 3ppm および 6ppm の試験区を設け，左舷の魚艙にはそれぞれに相当する対照区を設けた。いずれの魚艙にもまず約1.5トンの角氷を入れ，右舷の魚艙のみには予め海水 20*l* にといた CTC 液を漁獲直後の魚とともに適当量を加え，氷と魚と CTC 液とを順次に入れて，各魚艙とも総計2トンの氷と約3トンの魚で魚艙をみたした。魚艙内の温度は常に 0～3°C を保つように注意した。かようにして右舷の一つには CTC 製剤を計 120g (CTC として 12g)，他の一つには計 60g (CTC として 6g) を加えた。したがつて2トンの氷が全部溶解すれば CTC 製剤 120g 添加魚艙中の CTC 濃度は 6ppmに，CTC 製剤 60g 添加のものは 3ppm となるはずである。しかし保蔵の当初は高い濃度であつても，氷の融解とともに CTC は希釈され，また一部破壊して濃度は低下するであろうから，魚艙内の CTC 濃度は帰港までにかなり変動すると思われる。しかしこの確かめは船に乗組むことなしには困難である。これら試験区の魚艙の水氷は取換えることなく，11月9日帰港し，陸揚げしたので，6～7 日間水氷に保蔵したことになる。

3. 鮮度の測定および CTC 残存量の定量

陸揚げしたサバは直ちに急速凍結し，翌日研究室に運び，解凍後に官能検査を行い，皮および肉の CTC を定量した。なお一部は凍結4日後に解凍し，3～7°C の冷蔵庫に放置し，官能検査，肉の揮発性塩基窒素 (VBN) およびヒスタミン量の変化を追跡して保鮮効果を確認した。

VBN の定量は CONWAY の微量拡散法[2]により毎回1尾の肉について実施した。CTC の定量は富山・小林・米法[3]によつた。ヒスタミンの定量には太田氏の簡易法[4]の欠点を改正して用いた。太田氏の方法には発色が試薬の量および反応時の pH により異る欠点があることを知つたので，つぎのように変改した。魚肉 16g に 100cc の水を加えてミックサーで混和し，更に 50cc の 7% 三塩化酢酸を混和してから沪過し，沪液を2倍に希釈する。この 1cc に 0.5cc 1N HCl と 0.5cc 5% $NaNO_2$ とを加え5分間放置した後に 0.1% チモルブルーを1滴加え，希苛性ソーダ液で pH 9 までに中和し，4% Na_2CO_3 の 1cc を加えて3分間氷冷する。これに氷冷したヂアゾ試薬 (5cc 0.1% *p*-nitroaniline in 0.1N HCl + 0.1cc 5% $NaNO_2$) の 1cc を加え，氷水中に5分間放置する。つぎに酢酸エチル 15cc を用いて発色物質を抽出し，抽出液を 2cc の 1% Na_2CO_3 と 0.5cc の濃アンモニヤ水との混液で3回洗滌する。上層を分離し，脱水芒硝を加え，振盪した後，光電比色計で 530mμ のフィルターを用いて吸光度を測定し，ヒスタミンの標準曲線を用いて換算する。なおこの改良法でも，組織抽出液にあるヒスタミン以外の物質による阻害が著しいので，定量値は過大となり，単に相対的な意味しかもたない。この阻害はイオン交換樹脂によつて除きうることがわかつたので，近く報告する。

結果および考察

Table 1 にみられるように，CTC 濃度が約 3ppm の水氷中に6日間浸漬した場合には，肉への滲透量は平均 0.045 ppm (95% 信頼限界 0.033～0.057)，皮へは平均 0.797 ppm (95% 信頼限界 0.646～0.948) であり，6ppm の水氷中に7日間浸漬した場合には，肉への滲透量は平均 0.091 ppm (95% 信頼限界 0.064～0.118)，皮へは平均 1.25 ppm (95% 信頼限界 1.075～1.425) であつた。これらの肉中の CTC 残存量は米国およびカナダにおいて3年間ですでに 23 万トン販売された CTC 処理鶏肉の料理後の CTC 残存量に近似している。CTC 処理鶏肉を3年間消費した経験では，消費者にアレルギーや耐性菌の発現は全く問題となつていない。したがつてこの程度の CTC を含むサバ肉は生食されても差支えないといえる。

Table 1. CTC residue in muscle and skin of round mackerels which were placed immediately after catch in iced CTC–sea water and stored in it for 6～7 days.

CTC concentration to be obtained after ice being completely melted							
0 ppm		3 ppm		0 ppm		6 ppm	
muscle	skin	muscle	skin	muscle	skin	muscle	skin
ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
0.01	0.05	0.04	0.70	neg.	neg.	0.08	1.23
neg.	neg.	0.04	0.51	0.01	0.01	0.13	1.05
0.02	neg.	0.05	0.71	0.01	0.01	0.07	1.18
neg.	0.03	0.05	0.92	0.02	neg.	0.10	0.85
0.02	neg.	0.07	1.23	0.01	0.01	0.18	1.17
neg.	0.01	0.05	0.77	neg.	neg.	0.07	1.17
neg.	neg.	0.03	0.65	neg.	neg.	0.08	1.32
neg.	neg.	0.07	0.61	neg.	neg.	0.05	1.32
neg.	neg.	0.02	0.88	neg.	neg.	0.07	1.71
0.01	0.01	0.03	0.99	neg.	0.01	0.08	1.54
		0.045† ±0.012§	0.797† ±0.151§			0.091† ±0.027§	1.25† ±0.175§

† average. § 95% confidence limit.

つぎに皮から肉内部への CTC の滲透残存の様相は Fig. 1 からみて明らかなように，皮下 5 mm の間で急激に減少し，3ppm 区では 7mm より深い肉層に，6ppm 区では 9mm より深い肉層には検出限界濃度以下であつた。このような濃度傾斜は CTC 液に浸漬処理したサケ[5]，イボダイ[6]，エソ[8]等でえられた結果と類似している。

CTC 処理および無処理のサバを 3～7°C に放置中における鮮度低下の模様を官能検査，VBN およびヒスミン量で追跡した結果は Table 2, Fig. 2 および Fig. 3 のようである。官能検査では無処理区が 5 日で初期腐敗を示したのに，CTC 処理区はいずれも 7 日と延長した。この保鮮効果は Fig. 2 に示した背肉の VBN および Fig. 3 に示した腹肉の VBN によつても多少傾向は認められるが，背肉の VBN が 30mg·% の値を示す時は腐敗が甚しく進行しており，初期腐敗の段階を示すことはできない。これに対しヒスタミンの増加

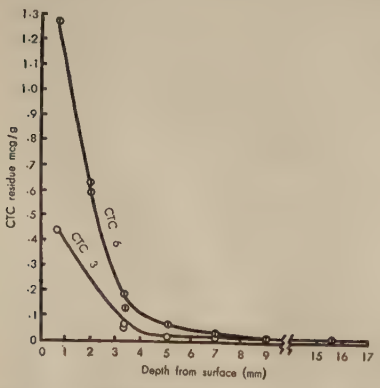


Fig. 1. Distribution of CTC in flesh of mackerel placed in iced CTC–sea water for 6～7 days.
○: dipped in 3 ppm CTC, ①: dipped in 6 ppm CTC.

Table 2. Organoleptic phases* of round mackerels held at 3～7°C.

Date of catch	Days of storage / groups	0	3	5	6	7	8
XI/3	control	I a	I b	II b–III	III	IV	
	3 ppm	I a	I a	I b	II a	II b–III	III
XI/2	control	I a	I b	II b–III	III	IV	
	6 ppm	I a	I a	I b	II a	II b–III	III

* I a: Perfectly fresh. Eyes brilliant. Surface fresh, natural color. Gills red. Flesh firm. Odor no fishy. I b: Eyes slightly sunken, lost brilliancy. Surface natural color. Gills dark red. Flesh slightly soft. Odor fishy. II a: Eyes opalescent and sunken. Surface natural color. Gills dark red, bad odor. Flesh slightly softer. Odor fishy. II b: Eyes grey and sunken. Surface lost brilliancy. Gills dark red, bad odor. Flesh softer. Odor stale. III: Eyes sunken, hemorrhagic, spotted with bacterial colonies. Surface fading, turbid. Gills fade, slimy putrid odor. Flesh very soft. Odor putrid. IV: Eyes deeply sunken, hemorrhagic, covered with bacteria. Surface fade, soft, slimy. Gills fade, sticky putrid odor. Flesh very soft. Odor very putrid.

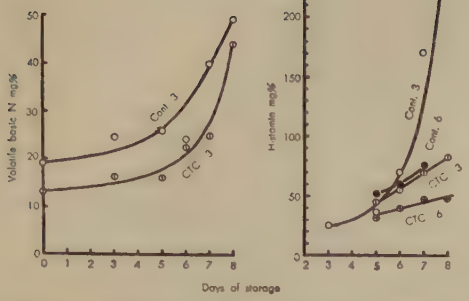


Fig. 2. Change in volatile bases N and histamine of back flesh of round mackerel during storage at 3～7°C.

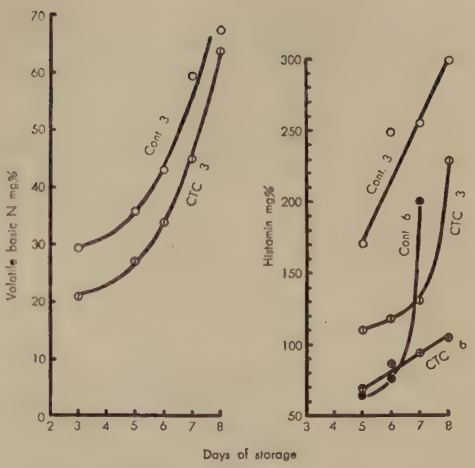


Fig. 3. Change in volatile bases N and histamine of ventral flesh of mackerel during storage at 3～7°C.

量は鮮度の客観的尺度として適当であることは Fig. 2 および Fig. 3 から明らかである。このことはサバを CTC 水氷で船上保蔵すると，市場から消費者に渡るまでの間にヒスタミンの生成が抑制され，これによる中毒がある程度防ぎうることを示している。

摘　　要

ハネ釣したサバを船上で CTC 水氷に浸漬保蔵し，約1週間後に陸揚げしてから肉および皮への CTC の滲透量を求め，また 3～7°C に放置中の鮮度保持効果を検討してつぎのような結果をえた。

1. 水氷中の CTC 濃度が約 3 および 6 ppm の場合，肉中への滲透量は 10 尾の平均それぞれ 0.05 および 0.09 ppm であつた。このような筋肉を生食してもアレルギーや耐性菌出現の懸念は全くないことを論議した。

2. CTC は皮下 5 mm まで滲透するが，CTC の内部に向つての濃度傾斜は急であり，また 5 mm 以下は極めて微量であつた。

3. 水氷中の CTC 濃度が 3 および 6 ppm の場合，皮への滲透量は 10 尾の平均それぞれ 0.8 および 1.25 ppm であつた。

4. CTC 処理および無処理のサバを 3～7°C に放置した場合，無処理が 5 日で初期腐敗を示したが，処理魚では 2 日位延長した。

5. 3～7°C に保蔵したサバの肉中のヒスタミン生成は船上で CTC 処理することによつて明らかに抑制された。

本研究は日本レダリー KK の援助により行つた。また CTC の定量その他には北原慶子，豊田恭平，森健児の諸氏の助力を受けた。ここに特記して謝意を表する。

文　　献

1) 富山哲夫・黒木俊一・前田伝喜・浜田盛治・本田　彰：本誌，**22**，120 (1956).
2) Conway, E. J.: 1939, Micro-diffusion analysis and volumetric error, p. 75～81, London. Crosby Lockwood and Son, Ltd.
3) 富山哲夫・小林邦男・米　康夫：本誌，**24**，937 (1959).
4) 太田冬雄：本誌，**24**，41 (1958).
5) 富山哲夫・米　康夫・小林邦男：本誌，**24**，1012 (1959).
6) 米　康夫・富山哲夫・浜田七郎：本誌，**25**，158 (1959).

テトラサイクリン類による処理が加工食品の品質に及ぼす効果—II.
CTCを併用したサケ塩蔵品中のCTC残存量および製品の品質向上*

富山哲夫・米康夫

(1959年4月11日受理)

EFFECTIVENESS OF TETRACYLINES TREATMENT ON QUALITY IMPROVEMENT OF PROCESSED FOODS—II. QUALITY IMPROVEMENT AND CHLORTETRACYCLINE RESIDUE OF SALT SALMON DUE TO CTC-TREATMENT

Tetuo Tomiyama and Yasuo Yone**

The aims of this paper is to study the effectiveness of chlortetracycline (CTC)-treatment in quality improvement of salt salmon and to determine the CTC residue and its distribution in the salt salmon.

When CTC (0.3 ppm)-containing minced flesh alone was kept at −3 to 5°C, spoilage was hardly observed within 14 days as compared to the occurrence of incipient spoilage on the 5th day in case of flesh with no CTC. The CTC-containing flesh being mixed with 10% sodium chloride did not manifest any sign of spoilage after a two-week storage.

The penetration of CTC into semidressed sockeye salmon which was salted with CTC (21 ppm)-containing salt was higher in belly part than in back and tail flesh. CTC in various parts of salmon flesh was found inactivated rather readily during the storage at 0 to 5°C.

The CTC residue of salt chum salmon which was dipped for 30 minutes in a 56 ppm CTC-sea water solution prior salting was found less than 0.1 ppm after a 9-month storage. The distribution pattern of CTC in the salt salmon flesh was similar to that in flesh of dip-treated fresh salmon except for low content near the skin. This abnormal low content can be accounted for by the destruction of CTC coupled with the oxidation of oil beneath the skin. On broiling the salt salmon the CTC residue was further decreased to a value lower than 0.02 ppm level.

サバおよびイワシの塩蔵工程にクロールテトラサイクリン(CTC と略記)を適用すると，塩の使用量が減らせること，および品質が良くなることについて前報[1]で報告した。本研究ではサケの塩蔵工程に CTC を適用した場合における品質向上効果，CTC の体内分布および貯蔵中の CTC の減少について検討したので，以下報告する。

研究方法

1. 研究材料: 48°42′N, 168°31′E で漁獲され，1958年5月24日に母船揚げされたベニザケ(平均体重1.6kg)および 50°54′N, 167°37′E で漁獲され，同年6月17日に母船揚げされたシロザケ(平均体重 1.7 kg)を使用した。

---

* 本研究の概要は昭和 33 年 10 月に日本水産学会秋季大会(新潟市)において発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem. Fac. Agr. Kyushu Univ.).

(印刷費負担)

2. CTC 含有塩による塩蔵処理: ベニザケの場合には冷凍サケ（体重 1.4kg, 体長 45cm）を解凍後，内臓および鰓を除去して水洗し，水切りしてから直ちに 3mg の CTC を混入した 140g の局方食塩（CTC 含量 21ppm）を腹腔および表皮全面に均一に塗布した後，ポリエチレンの袋に包んで 0～5°C の冷蔵庫に放置した。なお放置中に滲出した体液は毎日注意して除いた。食塩および CTC が魚体内に充分滲透したと考えられた 9 日目から，CTC の滲透量を測定した。CTC 定量の試料は背部，腹部および尾部の肉それぞれ 20g を用いた。

3. 工船上における CTC 浸漬魚の塩蔵: 工船に揚げられたシロザケ 10 尾から内臓および鰓を除去し，洗滌後，そのうち 5 尾を CTC 56ppm 含有海水の 18l に 30 分間浸漬した。この時の浸漬温度は 6.5°C，魚体温度は 6.5°C およびデッキ温度は 8.7°C であつた。浸漬を終えてから魚体の 16% 相当の塩を撒布し，−7°C の部屋に一昼夜放置し，次に −20°C の冷蔵庫に搬入保管した。次いで仲積船で 7 月 5 日東京港に入港，−20°C に保蔵し，1959 年 2 月 6 日航空便で福岡に運び，分析に供した。

4. CTC の定量: 定量には富山，小林，米の簡易 cylinder plate 法[2]を用いた。この定量法には食塩の妨害作用はないが，試料組織中の油脂の過酸化物による阻害があるようである。CTC の滲透の模様を細かく知るためには，組織をカンナで薄層に切り，各片について定量した。この場合には試料が 1.6g～3.1g であつたから，ミクロブレンダーを用いて混和抽出した。

5. 揮発性塩基窒素（VBN と略記）の定量: 富山，原田の高温減圧蒸溜法[3]により定量した。

研 究 結 果

1. CTC 含有サケ肉に食塩を混和した場合の防腐効果および保蔵中の CTC の減少

塩蔵品の CTC 処理による品質向上効果を知るためには多数の試料を要するので，次のようなモデル試験を行つた。CTC に浸漬処理したベニザケおよび無処理のベニザケの背肉を皮下 5mm の部分まで採り，これを擂砕し，その一部に NaCl を 10% 混入した。かように調製した CTC を含む組織，含まないもの，無塩のもの，および含塩のものをそれぞれ 1g ずつ多数の 1cm 径の試験管に入れて 25～29°C および −3～5°C に放置した。その結果は Fig. 1 にみられるように，低温においた場合にも CTC および NaCl を含まない対照の肉は 5 日目以後急激に VBN が増加し，7 日目には完全に腐敗した。これに対し CTC 0.3ppm を含む肉は CTC 量が 0.06ppm に減少した 7 日目から VBN が僅かに増加した程度であり，CTC および食塩を含む肉の VBN は CTC が 0.02ppm に減少した 7 日目以後においても増加なく，試験開始後 14 日間変化しなかつた。

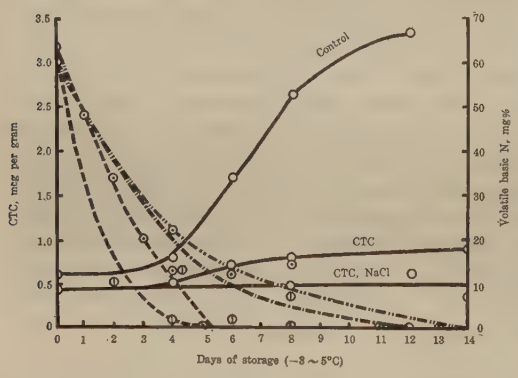


Fig. 1. Change in VBN and CTC content of minced sockeye salmon flesh with or without NaCl when kept at −3～5°C or 25～29°C.
VBN. —○—; CTC without NaCl at −3～5°C, —··—⊙—··—; do. at 25～29°C.
– – ⊙ – –; CTC with NaCl at −3～5°C, —·—①—·—; do. at 25～29°C, – – ① – –,

他方，CTC の減少をみると，室温では勿論，低温においてもかなり速かに減少した。室温放置の場合には食塩が存在すると，CTC の減少速度が大きくなつたことは注目に価する。

2. 塩蔵中における CTC の滲透および減少

CTC を含む食塩をベニザケに塗布塩蔵してから 0～5°C に保蔵後，9 日目における各部筋肉への滲透量および更に保蔵を続けた場合の CTC の減少量を測定した結果は Fig. 2 に示すようである。滲透量は腹部に多く，背肉および尾肉の 2 倍であつた。これは腹腔よりの滲透の多いことを明示している。9 日目以後の減少をみると，魚体のいずれの部分においてもかなり速かに減少し，製造してから 24 日後の CTC の残存

率は9日目の値に対して腹肉，尾肉および背肉ではそれぞれ 16%，16% および 18% に相当した。なお，この塩蔵後2日間に滲出した体液は約 150cc であり，その CTC 含量は 12.8ppm，また8日後の可食部（皮および肉）の CTC 総量は約 0.4mg であつた。従つて食塩に含まれた CTC 量の約 64% は見かけ上滲出部に流失し，約 23% は滲出部，魚体表面および組織内で失活した計算になる。

3. 塩蔵シロザケにおける CTC の分布および焙焼による破壊

工船上で先ず CTC-海水に浸漬処理し，次に塩蔵したシロザケ中の CTC 残存量を，製造後約9ケ月後に定量した結果は Table 1 のようである。CTC 処理区の塩蔵魚には皮（鱗を含む）および鰭に多く，肉に最も少い点は，冷凍ベニザケの場合[4]と同様であつた。肉の CTC 量は腹部，背部，尾部いずれの部分においても殆んど 0.1ppm 以下であつた。対照区の魚の表面，即ち皮および鰭に僅かの CTC が認められたのは，恐らくは CTC 処理魚と接触して微量の CTC が附着したか或いは抽出剤にとけた表皮の酸化脂肪が検定菌の発育を阻止したためであろう。

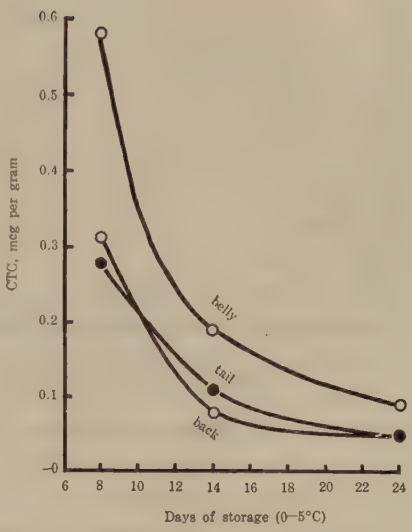


Fig. 2. CTC-contents in various parts of salt sockeye salmon flesh and their decrease during the storage.

Table 1. Distribution of CTC in various tissues of CTC (56ppm)-treated salt chum salmon

Treatment	None			Dip in CTC-sea water				
fish no.	#1	#2		#3	#4	#5	#6	
date of assay	II/9	II/13		II/9	II/13	II/13	II/25	
body size (cm)				44	46	46	46	
Tissues	mcg/g CTC			mcg/g CTC				
			Ave.					Ave.
Skin back	.09	.03	.06	.17	.26	.13	.31	.22
Skin belly	.09	.06	.08	.07	.08	.07	.10	.08
Skin tail	.11	.06	.09	.15	.37	.13	.24	.22
Flesh back	neg.*	neg.	neg.	.02	.07	.12	.03	.06
Flesh belly	neg.	.02	.01	.03	.04	.02	.07	.04
Flesh tail	neg.	neg.	neg.	.02	.16	.08	.04	.08
Fin dorsal	.02	.02	.02	.13	.25	.39	.28	.26
Fin pectral	.02	.04	.03	.12	.15	.25	.20	.18
Fin ventral	.04	.08	.06	.15	.10	.50	.28	.26
Fin caudal	.02	neg.	.01	1.27	.56	.25	.48	.64
Fin anal	.02	.06	.04	.13	.16	.13	.06	.12
Opercle	neg.	.02	.01	neg.	.17	.22	.16	.18
Vomer		.03		1.32	.15	.16	.18	.16

* neg. indicates CTC-content smaller than 0.01mcg per gram tissue.

次に CTC 処理した塩蔵魚の表面から内部へかけての滲透模様を調べた結果は Fig. 3 に示してある。この滲透図をみると，表皮下に CTC の少い部分のある点が CTC 処理冷凍ベニザケの場合[4]と異つている。皮下脂肪層が酸化していることは官能観察によつても明かに認められたので，この皮下に CTC が少いのは滲透した CTC が脂肪の過酸化物によつて破壊されたためであることは明かである。

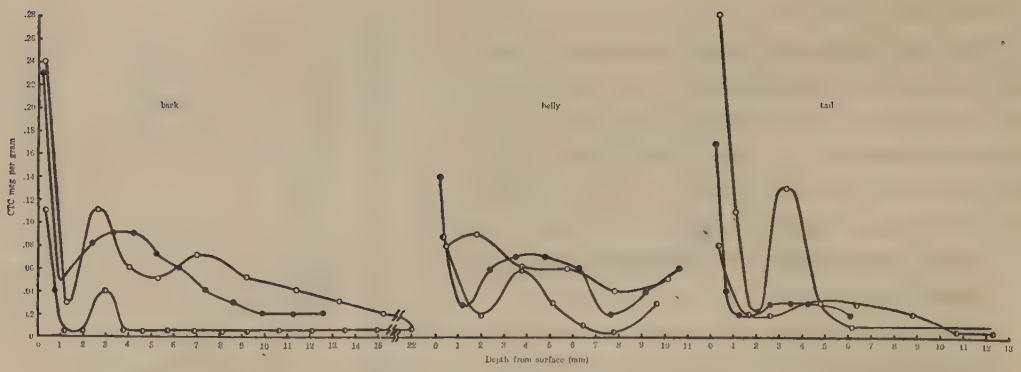


Fig. 3. CTC-penetration pattern in back, tail and belly flesh.

塩蔵シロザケを約 1.5cm の厚さに切り，220～236°C のオーブン中で焙焼した結果は Table 2 の通りである。焙焼後 CTC の検出されなかつた試料は 40%，検出されたものの平均値は 0.02ppm であつた。

Table 2. Destruction of CTC-residue on broiling unskinned salt chum salmon steaks

CTC, mcg/g before broiling	CTC, mcg/g, after broiling†					
	#1§	#2	#3	#4	#5	#6
Ave.						
.04	.02	neg.*	neg.	.02	.03	
.07	neg.	.02	.02	.02	.02	.02

† 7 minute-broiling at 230～236°C.
§ Steak number.
* neg. = < 0.01 mcg/g CTC.

考　　察

塩蔵に CTC を使用して良質の製品を得ようとする試みは，サバおよびイワシで既に成功した[1]。この場合，残存 CTC の塩蔵中或いは製品保蔵中の破壊が比較的に早かつたので，塩蔵の場合には CTC は食品添加剤として許容されてよいことを明かにした。

本研究においても CTC を含む塩でベニザケを塩蔵した場合，CTC の減少は低温でもかなり速かであつた。この減少の原因としては，(1) 塩蔵中に失われる組織水分と共に流失すること，(2) 塩蔵中に混入した血液或いは組織分解物による CTC の破壊促進，(3) 酸化脂肪による CTC の酸化分解等があげられる。ベニザケ塩蔵の場合，これらのうちでどの影響が最も支配的であるかについてみると，(1) による流失は塩蔵後 9 日目に約 64% に達し，恐らく (2)，(3) 等による失活が約 23% と見積られる。勿論低温での塩蔵においては (1) は塩蔵の初期に起り，(3) は主として貯蔵中に起る減少である。(3) の要因が CTC の破壊に対し重要なことは塩蔵シロザケの体分分布において酸化した皮下の脂肪層の部分に CTC が少いことから分る。Fig. 1 をみると，組織中の CTC は室温では食塩の存在によつて多少早く破壊されるが，これは食塩そのものによるのか，食塩の存在による二次的な影響かは不明である。

CTC 含有塩で塩蔵したベニザケの筋肉中における CTC の分布で興味ある点は腹肉に多いことである。塩蔵魚で最も変敗し易い腹部に CTC の滲透量が多いことは，CTC の併用によつて塩蔵品の品質が向上した主因であろう。また CTC 海水に浸漬してから塩蔵し，低温で長期間保蔵したシロザケの筋肉中の CTC 分布をみると，表層のみにあつて深部にはない点は CTC 処理鮮魚の場合と同様であるが，腹肉では内部から CTC が滲透したために腹腔に向うに従い CTC が増している。この点はベニザケの場合と同様に鮮度保持の点から重要視さるべきである。この長期保蔵した塩蔵シロザケ肉内の CTC 分布で特異的な点は，いずれの部分においても皮下に CTC が最も少ないことであつて，これは皮下脂肪の酸化に伴つた CTC の失活によると思われる。体表面における CTC 分布は不均一であつて，尾鰭および頸骨に最高 1.27－1.32ppm あつた以外は，概ね neg.—0.56ppm の範囲であつた。

塩蔵サケの場合には生食されることはなく，多くの場合焙焼される。焙焼後における皮付肉の CTC の残

存量は neg.—0.03 ppm であつたので，塩蔵工程に CTC の使用は許可されてよいといえる。

CTC 処理によつて塩蔵サケの品質がどの程度良くなるかについては，本研究では擂砕肉を用いてモデル試験を行つたに過ぎないが，0.3 ppm 程度の CTC をもつた肉に 10% の食塩を加えると完全に腐敗が抑制された。勿論，内臓抜きの魚体のままでは CTC は筋肉内に均等には滲透しない。従つて表皮および皮に近い層に滲透した CTC が外部から侵入した細菌の発育を抑制している間に，食塩が筋肉内に滲透すれば，組織が脱水され細菌の繁殖も抑制されるので，良質の塩蔵品が得られる筈である。もし筋肉の深部に細菌が既に繁殖した原料，即ち鮮度の悪い原料の場合には勿論 CTC と食塩との共用によつて良質の塩蔵品は期待できないであろう。

撒塩塩蔵の場合に，CTC を含む塩で塩蔵する方法と魚体を予め CTC 処理した後に塩蔵する方法との間の得失を論ずるには，本研究の範囲では困難である。しかし塩蔵作業の上から考えると，もし塩蔵処理能力が不足して原料の鮮度が低下する懸念がある場合には，先ず魚体を CTC 液浸漬処理或いは撒布処理をして細菌の侵入を抑え，次に塩蔵すべきである。しかし漁獲量に対して塩蔵処理能力が充分にある場合には，内臓を除去し洗滌後，成るべく速かに CTC を含む塩で塩蔵した方が操作の点では簡単である。

総　　括

1. 滲透した CTC の 0.3 ppm を含むベニザケ肉は低温でよい鮮度を保持したが，更に 10% NaCl を加えることによつて VBN の増加は完全に抑制された。

2. CTC 含有塩でベニザケを撒塩した場合における CTC の肉への滲透量は腹肉が最も多く，背肉および尾肉の約 2 倍であつた。この滲透量は 0～5°C においても比較的に速かに減少した。

3. CTC–海水に浸漬したシロザケを塩蔵し 9 ケ月低温に保蔵すると，筋肉部の CTC は 0.1 ppm 以下であつた。筋肉内部への CTC 滲透模様をみると，皮下の脂肪層に少く，腹部の内面に多いのが注目された。

4. CTC を含む塩蔵シロザケ (0.04 ppm) を焙焼すると，検出できない試料 40%，検出されたものの平均値は 0.02 ppm であつた。

本研究の試料の調製は日本水産 KK に依頼し，実施に当つては柿本・恒松両氏の御尽力をえた。また実験用の CTC の供与は日本レダリー KK に仰いだ。更に研究室においては北原慶子・森健児・豊田恭平の諸氏に助力をえた。ここに本研究の遂行に援助された各位に深謝の意を表する。

文　　献

1) 富山哲夫・杉谷　徹：本誌，**24**，581 (1958).
2) 富山哲夫・小林邦男・米　康夫：本誌，**24**，1012 (1959).
3) 富山哲夫・原田悠三：本誌，**18**，112 (1952).
4) 富山哲夫・米　康夫：本誌，**25**，67 (1959).

クロルテトラサイクリンの化学的定量法—I.
一新螢光定量法

富山哲夫・米　康夫・北原慶子

日本水産学会誌
第二十五巻 第三号 別冊
昭和三十四年七月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 3, July, 1959.

クロルテトラサイクリンの化学的定量法—I.* 一新螢光定量法

富山哲夫・米 康夫・北原慶子

(1959 年 5 月 21 日受理)

A CHEMICAL METHOD FOR DETERMINATION OF CHLORTETRACYCLINE—I. A NEW FLUOROMETRIC METHOD

Tetuo Tomiyama, Yasuo Yone and Keiko Kitahara**

Since chlortetracycline (CTC)–containing ice is being widely used for keeping the freshness of trawler's catches in the western sea area of Japan, a practical field method for the determination of CTC incorporated in ice is needed for field test of concentration, distribution and destruction of the antibiotic in the ice.

The method herein reported is based on a linear relationship between the chlortetracycline concentration and the intensity of fluorescence produced on irradiation of aluminum chelate of chlortetracycline with ultraviolet ray.

The method for the determination is as follows: To a 10 cc. aliquot of sample and each of standard solution series (1～5 mcg. per cc.) add 1 cc. of a 1% potassium alum ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) solution in M/2 acetate buffer of pH 4.6. Allow it to stand from 20 to 60 minutes at room temperature. Measure the fluorescence of the sample at 500 mμ which is produced with excitation light of 365 mμ or 436 mμ. Similarly, measure the fluorescence of the alum-containing standard solutions, subtract blank value from each measured intensity of fluorescence, and draw a standard curve by plotting the intensity of fluorescence against the concentration of CTC. A representative standard curve is shown in Fig. 9. From the standard curve read the CTC concentration of the sample solution corresponding to the intensity of fluorescence from which blank value is subtracted.

I. 緒 言

クロルテトラサイクリン (CTC と略記) を含む氷が以西底引漁獲物の鮮度保持に現在広く使用されている。これに対し厚生省は氷中の CTC 量は 5 ppm 以下であることを規定しているので，氷中の CTC 量の簡易な化学的定量法が食品衛生の立場から要求されている。

著者の 1 人 (富山) はアルミ鍋で煮沸し冷却した水道水中で CTC が紫外線照射により黄金色の螢光を放つことを偶然に観察したので，この螢光分析によつて CTC の定量が可能ではないかと想像して本研究を行つた。分光光度計を用いて先ず種々の金属イオンによる螢光度の差異をみたところ，アルミニウムイオンの存在によつて CTC の螢光が最も強く現われるのを見出したので，定量法の決定に必要な種々の条件を検討した結果，一新定量法を決定することができた。

II. 定 量 法

1. 試薬，標準液および試料の調製

a. 試薬: 1%カリ明礬液: 1 g のカリ明礬 $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ を pH 4.6 の M/2 醋酸緩衝液 100 cc

* 本研究の大要は 1958 年 4 月東京における日本水産学会年会で報告した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem. Fac. Agr. Kyushu Univ.).

(印刷費負担)

にとかす。この緩衝液はつぎのようにして簡単に調製できる。先ず約 1 M 酢酸の 50 cc をフェノールフタレインを指示薬として約 1 M 苛性ソーダで中和し滴定値を求める。この滴定値の半量を前記 1 M 酢酸の 50 cc に加え，全量を 100 cc に定容すれば pH 4.6 を示す。

b. CTC の標準原液: クロルテトラサイクリン塩酸塩の 100 mg を蒸溜水にとかし 200 cc に定容する。この液 1 cc を小試験管に入れ凍結する。この状態に保存すれば約 2 ケ月は変化しない。

2. 定量装置

本研究では日立製作所製分光光度計 EPU-2 型を使用し，10 mm の螢光測定用キュベットを用いた。第一次フィルターには 365 mμ 或いは 436 mμ のものが使用できるが，iso-CTC の混在する恐れのある場合には後者のフィルターを用うべきである。

3. 定量操作

1 cc の CTC 標準原液を蒸溜水で 100 cc に稀釈し 5 mcg/cc の液をつくる。これを更に蒸溜水で稀釈して 4, 3, 2 および 1 mcg/cc の標準系列をつくる。これらの標準液 10 cc および試水 10 cc に 1 %カリ明礬試薬 1 cc ずつをそれぞれ混和し，20 分放置後よく攪拌してから螢光測定用キュベットにいれ，365 mμ 或いは 436 mμ 附近の励起光線を照射して生ずる 500 mμ の螢光を分光光度計で測定する。分光光度計の同一感度の条件で測定した標準液の螢光から濃度対螢光の関係を示す標準曲線を画き，これを用いて試料の CTC 濃度を求める。

本定量で注意すべきことは水洗で除き難い Al-キレートがキュベットに附着して盲検値が見掛け上大きくなることがある。したがつてキュベットはクエン酸・塩酸混液でしばしば洗滌せねばならない。

なおこれらのカリ明礬試薬を加えた標準系列および試水は室温で 3 時間は一定の螢光を示す。その後次第に増加し，室温では 2 日，冷蔵庫 (5～−3°C) 内では 2 週間は初めの螢光の 1.0～1.3 倍の螢光を保つている。

III. 実験結果および考察

1. CTC とキレートして螢光を発する金属

CTC とキレートして螢光を放つ金属を定性的に探したところ，Al, Ba, Mg, Ca, Zn, Th, Hg, Mn, Pb および W にこの性質のあることを知つた。これらの金属のうちで強い螢光を放つた Al, Mg および Th について再検討した。金属が CTC とキレートする場合には金属と CTC との比は多くの場合 1 原子：1 分子であり，またこのキレートの安定度はその溶液の pH によつて異なると報告した石館・坂口両氏[1]および坂口氏等[2]の研究にもとずき，CTC の一定量に対する各種金属の添加量の割合およびそれら溶液の pH を一定にして，各金属キレート化合物の螢光度を比較した。その結果は Table 1 に示すようで，pH 4.6 および pH 6.0 のいずれの場合にもアルミニウムとのキレート化合物が最も強い螢光を放ち，ついで Th, Mg, Zn の順であつた。しかし解離度の大きいキレート化合物は 1 : 1 の比以上の金属を加えなければ CTC は完全にキレートしない

Table 1. Relative intensity of fluorescence of metal-CTC chelates*

Kinds of salt	%	max. (mμ)	Intensity of fluorescence	
			pH 4.6	pH 6.0
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	.00496	500	41 (48)	77 (26)
$Al_2O(CH_3COO)_4 \cdot 4H_2O$	.00198	500	12 (13)	15
$Th(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$	.00580	510	12 (6)	6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	.00258	510	1	2
$PbCl_2$	.00296	500	0	1
$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$	.00396	500	2	2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	.00154	470	1	5
$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	.00353	470	6	6

* 10 cc. of CTC (5 mcg./cc.) in M/16 acetate buffer (pH 4.6) plus 1 cc. of metal salt solution.
Values were obtained shortly after mixing with the reagent, and values in parenthesis were those after a 20-minute standing.

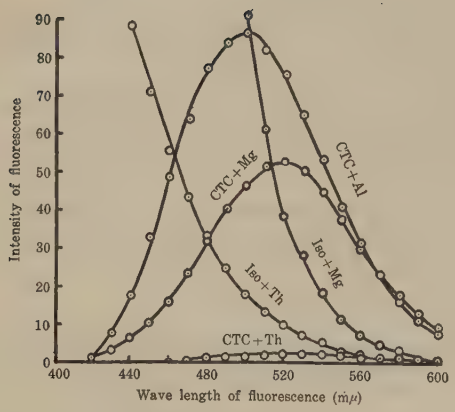


Fig. 1. Fluorescence curves for metal chelates of CTC and iso-CTC.

Experimental conditions for preparing chelates were as follows: CTC + Al, 10 cc. of CTC (5 mcg./cc.) plus 1 cc. of 1% Alum in M/2 acetate buffer; for CTC or iso-CTC+Mg, 10 cc. of CTC or iso-CTC plus 4 g. of $MgSO_4$ and 300 mg. CH_3COO-Na; for CTC or iso-CTC+Th, 10 cc. of CTC or iso-CTC plus 1 cc. of 0.1% Th $(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$ in M/2 acetate buffer.

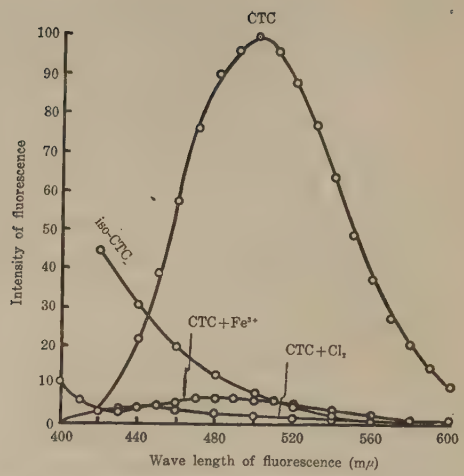


Fig. 2. Fluorescence curves for CTC and decomposed CTC in the presence of Al^{3+}.

Experimental conditions for preparing decomposed CTC were as follows: CTC + Fe^{3+}, CTC (5 mcg./cc.) plus 20 ppm of Fe^{3+}($FeCl_3$), measurment being made after 3-day standing at room temperature; CTC + Cl_2, CTC (5 mcg./cc.) plus Cl_2 (10 ppm), fluorescence being measured shortly after the addition.

し，またキレート化合物が最も強い螢光を発する pH は金属の種類によつて異なり，また各種金属キレート化合物の最大螢光波長も金属の種類で異なる。それ故に，Al, Mg, および Th について最大の螢光を発する条件を求め，この条件における螢光度を分光光度計を用いて測定したところ，Fig. 1 に示すように Mg の螢光は Al のそれの約 1/1.7, Th は Al の約 1/34 であつた。

2. CTC および CTC 分解物の螢光曲線

本反応を水中の CTC の定量へ発展させるためには，CTC と Al とのキレート化合物の螢光曲線を知ること，また CTC の熱およびアルカリによる分解物である iso-CTC，水中の Fe^{3+} および Cl_2 による酸化分解物等が Al^{3+} の存在でどのような螢光曲線を示すかを知らねばならない。因て 5 mcg/cc の CTC，或いは CTC の分解液を定量法にしたがつて処理し，30 分後に分光光度計を用いてそれぞれの螢光曲線を画いた結果は Fig. 2 に示すようである。すなわち CTC の Al キレート化合物の最大螢光波長は 500 mμ であり，Fe^{3+} および Cl_2 で酸化した分解物の 500 mμ の螢光度はそれぞれ CTC の 6% および 2% であつた。他方 iso-CTC の 500 mμ における螢光は 8% を示したが，436 mμ の第一次フィルターを用いると，この値は Fig. 3 に示すように 4% と減少した。

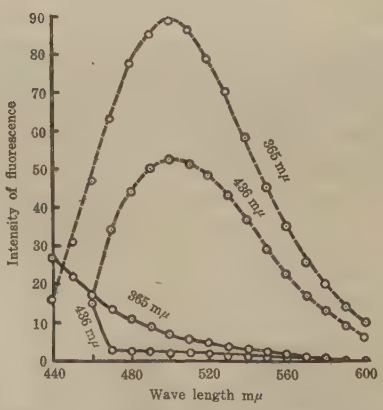


Fig. 3. The effect of primary filter characteristic (436 mμ, 365 mμ) on fluorescence of CTC and of iso-CTC in presence of Al^{3+}.
--○-- CTC + Al
—○— iso-CTC + Al

5 ppm 以下では CTC 濃度および iso-CTC 濃度と螢光度との間にはそれぞれ Figs. 9 および 4 に示す

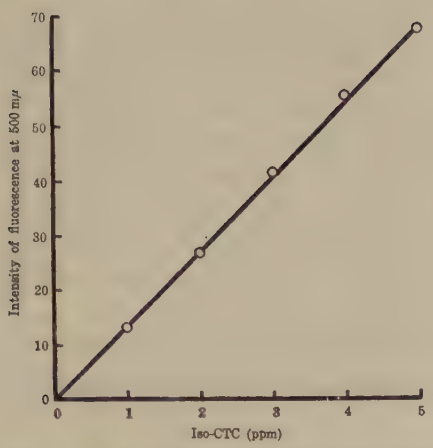


Fig. 4. Relationship between concentration and fluorescence of iso-CTC in presence of Al^{3+}.

ように直線関係があるので，もし水中の 5 ppm の CTC が破壊して 4, 3, 2 および 1 ppm に減じ，その分解物がすべて iso-CTC であつたとした場合，本定量法値のもつ誤差は容易に算出できる。365 mμ の第一次フィルターを用いた場合の算出誤差と実験的に求めた誤差とは Table 2 に示すように近似しており，CTC が iso-CTC に比して少い場合はかなりの誤差を招く。しかし 436 mμ の第一次フィルターを用いた場合にはこの誤差は小さい。実際に製造直後或いは 30 日経過した CTC 氷には iso-CTC は極めて少量 (1 ppm 以下) であつたから，定量値にはほとんど影響しないであろう。

つぎに Th および Mg と CTC のキレート化合物が最も強い螢光を発する条件を求め，その条件における CTC および iso-CTC の螢光曲線を画いた。その結果は Fig. 1 に示した通りで，Th 或いは Mg のキレート化合物の螢光が弱いために，iso-CTC の螢光との間に余り差がなかつた。したがつて iso-CTC が存在する場合には Th キレートとして CTC を螢光定量することは明かに不可能であり，Mg キレートとして螢光定量することも困難であろう。

Table 2. Interference caused by presence of iso-CTC

Primary filter (mμ)	Wave length for measuring fluorescence (mμ)	Sample solution CTC mcg./cc.	Sample solution iso-CTC mcg./cc.	Calculated CTC mcg./cc.	Calculated % error	Found CTC mcg./cc.	Found % error
365	500	4	1	4.07	+ 2.0	4.15	+ 4.2
		3	2	3.14	+ 4.7	3.28	+ 9.3
		2	3	2.20	+10.0	2.30	+15.0
		1	4	1.27	+27.0	1.47	+47.0
436	500	4	1	4.04	+ 1.0		
		3	2	3.08	+ 2.7		
		2	3	2.12	+ 6.0		
		1	4	1.15	+15.0		

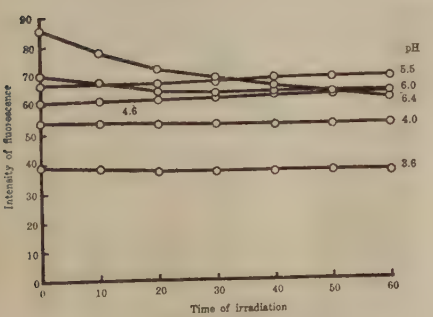


Fig. 5. The effect of pH on the fluorescence.

以上の結果から CTC の Al キレートが長波長の紫外線照射により螢光を放つ性質を利用して新定量法を確立しうる見透しがえられたので，つぎに定量の基礎条件を検討した。

3. 螢光度におよぼす pH の影響

SEREMBE[3] は CTC そのものの螢光は pH によつて変化すると報告している。坂口氏等によると CTC の金属キレートの安定度はその溶液の pH により異なる[1,2]。したがつて最も強く，且つ安定な螢光を与える pH を知るために，酢酸緩衝液で pH を数段階に調節した CTC 液に pH を同様に調節したカリ明礬試薬を加え，20～60 分後に螢光を測定した。Fig. 5 にみられるように pH 5.5 以下では測定中に螢光はほとんど変動しなかつたが，pH 6.0 以上では急激に減少した。これは Al キレート化合物が pH 6.0 以上では難溶なために溶液から析出してくるためであろう。以上の結果にもとずいて試料の pH を 4.6 に調整することにした。

4. 試薬添加後の螢光の時間的変化

1～5mcg/cc の CTC 液にカリ明礬試薬を添加した後，1 時間室温に放置中における螢光度の変化を分光光度計を用いて測定した。その結果は Fig. 6 に示すようであつて，螢光は 2～5 分後に最高値を示し，その後次第に減少して 20 分後より一定値に達した。したがつて分光光度計による螢光の測定は試薬添加後 20 分以後に行うべきである。なおこのカリ明礬試薬を添加した CTC 液を室温（25～28°C）および冷蔵庫（0～5°C）に長時間放置して螢光の変化を分光光度計を用いて測定したところ，Fig. 7 に示すように，いずれの場合も 3 時間内はほとんど一定の螢光を示したが，その後次第に螢光が強くなり，室温に放置した場合は 22 時間後に，冷蔵庫に放置した場合は 70 時間後に最高値を示した。その時のそれぞれの螢光は 30 分後の各螢光を 100 とすると 129 および 127 であつた。その後の螢光はいずれの場合にも次第に減少した。

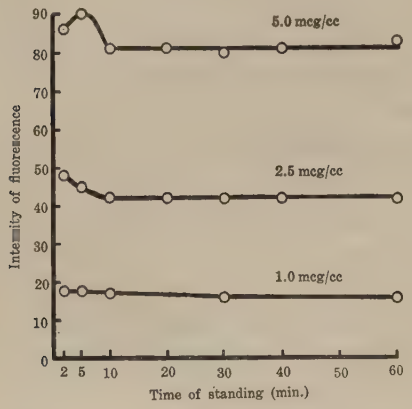


Fig. 6. The effect on the fluorescence of the time of standing after the addition of the reagent.

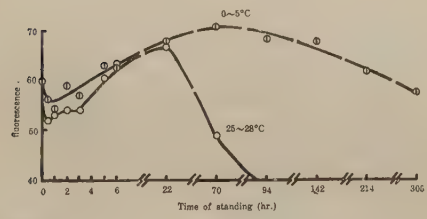


Fig. 7. The change in the fluorescence with time of standing for long duration.
○ at room temp., ① in refrigerator

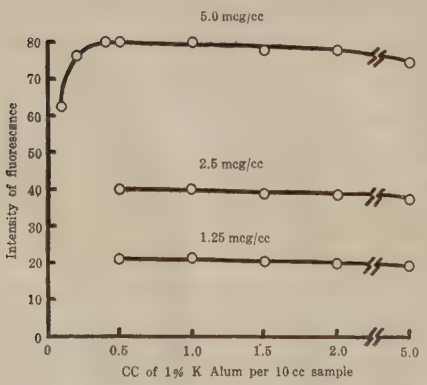


Fig. 8. The effect of amount of the alum reagent on the fluorescence.

5. 試薬の添加量と螢光の強さ

CTC 液に加えるカリ明礬試薬の量と螢光度との関係を求めた結果は Fig. 8 に示す通りで，0.4cc 以上では添加量を増しても螢光度の変化は少なかつた。したがつて本定量法では 10cc の試水に対し 1% カリ明礬試薬 1cc を添加する割合とした。

6. CTC 濃度と螢光度との関係

以上の基礎実験の結果，最大螢光を示すための条件が分つたので，それらの最適条件下で種々の濃度の CTC が Al^{3+} の存在で放つ螢光と CTC 濃度との関係を求めた。なおこの場合に CTC を蒸溜水に溶解し

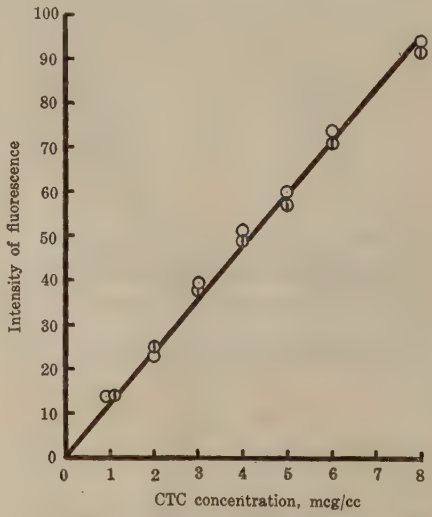


Fig. 9. Relationship between CTC concentration and fluorescence of CTC–Al–chelate.
○ CTC in distilled water, ① in tap water containing carboxymethylcellulose, $Na_2S_2O_3$ and NaCl.

Table 3. Data for a standard curve

CTC mcg. per cc.	Fluorescence reading					Average, ± stand. deviation	Calc.
8	100	102	103	102	107	102.8 ± 2.6	103.1
7	93.2	93.0	95.1	93.0	93.1	93.5 ± 0.9	90.7
6	76.5	75.5	77.6	76.2	76.0	76.4 ± 0.8	78.3
5	67.0	66.2	65.0	66.2	66.5	66.2 ± 0.7	65.9
4	51.3	52.0	51.0	48.0	55.0	51.5 ± 2.5	53.5
3	41.1	41.2	41.6	39.9	40.2	40.8 ± 0.7	41.1
2	29.2	30.5	29.5	30.4	30.1	29.9 ± 0.6	28.7
1	17.9	17.0	16.0	18.1	18.2	17.4 ± 0.9	16.3
0	3.3	3.3	3.8	3.0	3.6	3.4 ± 0.3	3.9

た液についてだけでなく，カーボオキシメチルセルローズ (CMC)，$Na_2S_2O_3$ および NaCl を市販の CTC 氷と同じ割合に水道水に溶解したものについても測定した。その結果は Fig. 9 および Table 3 に示す通りで，いずれの場合にも CTC 濃度と螢光度との間には 8 mcg/cc 以下では直線関係がみられた。なお蒸溜水と CMC，$Na_2S_2O_3$ および NaCl を添加した水道水との間には差が認められなかつた。CTC 濃度 (x) に対する螢光度 (y) の回帰直線の方程式を Table 3 に示した値から求めると $y-53.5=12.4\,(x-4)$ となり，また回帰係数の 99% 信頼限界は 12.4 ± 0.35 となる。

IV. 総　　括

CTC とアルミニウムとのキレート化合物の溶液に 360 mμ および 436 mμ 附近の励起線を照射すると黄金色の螢光を放出するので，これを利用した CTC の新螢光定量法を考案した。結果を要約するとつぎの通りである。

1. 螢光を放つ CTC の金属キレート化合物の内でアルミニウムが最も強い螢光を示した。
2. CTC のアルミニウムキレート化合物の最大螢光波長は 500 mμ であつた。
3. 安定な螢光を示す pH は 5.5 以下であり，本法では pH 4.6 を選んだ。
4. 試薬として加えるカリ明礬の濃度は一定量以上存在すれば，螢光度には僅かしか影響しなかつた。
5. 試薬を添加してから螢光が安定するのは 20 分から 3 時間の間であつた。
6. CTC の塩素或いは鉄による分解物の存在は定量に影響しないが，iso-CTC の多量の存在は定量を阻害する。436 mμ の第一次フィルターを用いると，この阻害を小さくすることができる。

本研究は文部省科学研究費および日本レダリーの支援によつて遂行した。また実験には森健児，豊田恭平および岩崎富生の各位の助力を受けた。ここに各方面の厚意と協力とに謝意を表する次第である。

文　　献

1) Ishidate, M., and Sakaguchi, T.: *Pharm. Bull.* (Tokyo), **3**, 147 (1955).
2) Sakaguchi, T., Toma, M., Yoshida, T., Omura, H. and Takasu, H.: *Pharm. Bull.* (Tokyo), **6**, 1 (1958).
3) Serembe, M.: C. A., **46**, 1152. C. A., **50**, 1970.

組織中のクロルテトラサイクリンの簡易 cylinder plate 法

富山哲夫・小林邦男・米 康夫
(九州大学農学部水産化学教室)

A Practical Cylinder Plate Assay Method for Determination of Chlortetracycline in Tissues

Tetuo Tomiyama, Kunio Kobayashi and Yasuo Yone

The regular bioassay method for determination of chlortetracycline (CTC) residue in tissues[1,2,3,4] presents a difficulty when dealt with many samples for the analysis. Experiences have revealed that such procedures are very tedious as washing and drying of many Petri dishes, the preparation of assay medium in each dish and the standard curve for each set of determination.

Attempt has been made, therefore, to simplify the method without sacrificing its accuracy. It was ascertained that routine procedures could be greatly simplified by substituting the Petri dish with glass plate as was reported by Grady and Williams[1a]. It was found that the slope of inhibitory zone size on logarithm of CTC concentration remained constant irrespective of difference in plate and date of the determination. Therefore, the preparation of the standard curve at each determination can be omitted by employing the linear regression line instead when it is calibrated for the difference in zone size for 0.01 mcg/cc between the regression line and a sample test plate.

従来の pad plate 法[1] および cylinder plate 法[2] によつて組織中のクロルテトラサイクリン (CTC と略記) を定量する場合の欠点は組織抽出剤の不備に原因しており，抽出剤にクエン酸緩衝液・アセトン混合液を用いると，CTC の回収率が向上し，また定量操作が簡単になることを報告した[3,4]。

しかし多数の CTC 処理魚体の CTC 残存量を富山等の方法或は在来法で定量してみると，多数のシャーレを必要とし，検定用寒天培地の流し込みや，洗滌乾燥等の操作に時間を要し，また定量の度毎に阻止帯の径から CTC 量に換算するための標準曲線を描くのがかなりの面倒であることを経験したので，これらを簡略にした実用的な改良法を探求するために本研究を行つた。

器具および操作の簡易化は Grady・Williams 両氏の方法[1a] を変改することによつて実現できた。また標準曲線を毎回作る必要性について検討したところ，濃度の対数値と阻止帯径の大きさとの関係を示す直線の傾斜が常に近似していたので，回帰直線を用いれば標準曲線を毎回作る必要のないことが分つた。依て改良方法および改良の根拠について報告する。

簡易定量方法

1. 定量の準備

a) ガラス板: 市販の窓ガラス用の板ガラスを 26×31 cm に切断して使用する。

b) 金属枠およびパッキング: 厚さ 3 mm の真鍮板で内のりが 220×280×15 mm の長方形の枠をつくり，四隅に真鍮板の小片をつける。パッキングは厚さ約 6 mm のゴム板を内のり 210×270 mm，巾 13 mm の大きさに切断したもので，ガラス面と密着させるために 80～100°C の流動パラフィン浴に 1～2 時間浸

1958 年 12 月 8 日受理

潰して軟化させ，次にパラフィンを拭いとり，更に洗剤および石鹸で洗滌してから使用する。また定量に使用中は毎日煮沸水中で約5分間位殺菌をしないと，ゴム表面に附着した雑菌が培地に入ることがある。

c) 水平台: 均一な厚さの検定培地をつくるのにこの水平台が必要である。約2.5cm程度の厚いベニヤ板或は適当な板を机の上におき，水準器で完全に水平なことを確かめてから板を固定する。机の上に厚い板ガラスをおくのは，培地が急冷して均一に拡げ難いので不適当である。もし水平な台がえられない場合には緒方[5]が試みたように下面が 26×30cm 以上の大きさのアルミ製バットに約 400cc の 1.5% 寒天液を流して固化させ，その上に約 50°C に温めたガラス板をのせ，更に検定用の温めたガラス板，ゴム枠，金属枠と順次にのせて，次に検定培地を流せばよい。

d) 阻止帯径の見取器: 多数の阻止帯の径をカリパーで測定することは定量の能率を妨げるので，米国では Quebec colony counter[1e], Fisher-Lilly zone reader[2a] 等が使用されている。著者等は Fig. 1 のような阻止帯径見取器を自製して使用している。拡大鏡を取付ける腕は電気スタンドの腕を使用した。読みとりのためのガラス板は 10×10cm の窓ガラス板に 1mm 間隔の劃線を 36 本刻んだものである。60W の電球をつけた部分以外は内面を黒色とし，阻止帯を見易くする。

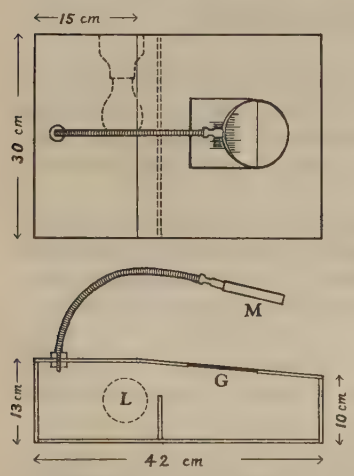


Fig. 1. Zone reader
M: magnifying lens
L: 60W-lamp
G: glass plate with mm. scale

e) シリンダー: ステンレスで造つた標準型で，外径 8mm，内径 6mm，長さ 10mm の大きさである。日本抗生物質学術協会から求めることができる。

f) 検定用培地: ペプトン（武田薬工のポリペプトン）6g，肉エキス 1.5g，酵母エキス（大五栄養 KK）3g および KH_2PO_4 3g を 1l の蒸溜水にとかし，加温後に 10g の活性炭（シラサギ印特級）を添加攪拌して数分後に沪過し，ガラス電極を用いて沪液の pH を 5.6 に 10% HCl 或は KOH で調整する。これに 15g の寒天末を加え，15 ポンド 10 分間滅菌する。

g) 胞子懸濁液: ペプトン 6g，カゼイン消化物（日産水産研究所“カザミノ酸”）4g，酵母エキス 3g，肉エキス 1.5g，グルコース 1g および $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g を 1l の蒸溜水にとかし，pH を 6.5～6.6 に調節し，これに 15g の寒天末を加え，15 ポンド 10 分間滅菌する。これを滅菌試験管に分注し，15 ポンド 15 分間滅菌後，斜面をつくる。別に冷蔵庫に保存した *B. cereus* var. *mycoides* (ATCC 9634) PCI-213 をこの斜面に 30°C 24 時間培養し，更に斜面に植え継いで 30°C に 24 時間培養した後，この一本の斜面の菌を約 10cc の滅菌水で洗いおとす。この菌懸濁液の濃度があまり濃厚では胞子化が遅延するので，660mμ のフイルターで透光率 5～20% 程度を示すような濃度とする。上記の胞子化用の寒天培地 50cc を 400cc 容の Roux フラコに入れて滅菌固化させたものの上にこの菌懸濁液の約 2cc を加え，滅菌ガラス玉を用いて培地の全面にひろげ，余分の菌液は捨てた後，綿栓する。これを 30°C に約 8～10 日間培養すれば胞子がえられるので，約 30cc の滅菌水で培地の表面より洗いおとし，50cc の共栓付遠心管に移し，65°C の湯浴中で 30 分間加熱する。冷却後遠沈し，上澄液を棄て，約 30cc の滅菌水で洗滌遠沈を 3 回繰返し，最後に再び 65°C で 30 分間加熱したものを共栓つき 50cc の三角フラスコに移して冷蔵庫に保存する。ここに造つた胞子懸濁液の培地への添加量は，予め種々の懸濁液量を加えた培地上で試験した 0.005～0.0025mcg CTC/cc の阻止帯が最も鮮明に読みやすいような量に決定する。

h) 抽出剤および稀釈剤: pH 5.2 のクエン酸緩衝液（M/5 クエン酸 100 容＋N/2 KOH 95 容＋水 5 容の混液）35 容にアセトン 35 容および蒸溜水 30 容を混合した液を抽出剤に使用する。標準 CTC 液を調製したり或は CTC 濃度の高い組織抽出液を稀釈するには pH 5.6 のクエン酸緩衝液（M/5 クエン酸 100 容＋N/2 KOH 100 容の混液）35 容にアセトン 35 容と蒸溜水 30 容を混和したものを用いる。

i) 修正用 CTC 標準液: 標準の CTC HCl の結晶 100.0mg を蒸溜水にとかし，100cc に水で定容し，その 1cc づつを小型試験管に分注し，ポリエチレン膜で蓋をし，凍結して保存する。凍結状態では1カ月間効力の低下はないが，融解したものは再び凍結保存はできない。上記小型試験管の内容 (1mg CTC) を蒸溜水で溶解して 100cc に定容し，その 1cc を稀釈剤で 100cc に定容し，更にこの 10cc を稀釈剤で 100cc に定容した 0.01 mcg/cc のものを使用する。冷蔵庫に保存すれば，数日間 CTC 濃度の減少はない。

j) 組織抽出液: 供試組織は予め細断した後に，少量づつミクサーに加えて捕碎する。これから 20.0g をとり，乾いた別のミクサーに入れ，前記の抽出剤 80cc を加え，蓋をして約2分間混和抽出する。約 15 分間放置して全分，蛋白質を凝固させた後，乾燥の紙で沪過し，沪液を供試する。但し CTC の多い組織では抽出剤を前記の稀釈剤 (pH 5.6) で適当に稀釈して供試せねばならない。

2. 定量方法

先ずよく洗滌したガラス板と大型試験管を約 75°C の乾燥機で乾燥加温しておく。他方予め調製した検定用培地を加温溶解して，60°C の湯浴に保つておき，次に胞子懸濁液の最適量をよく混和する。これを 50cc づつ大型試験管に分注し，60°C の湯浴中に保つておく。

前記の温めたガラス板を水平台の上におき，ゴムパッキング，その上に金属枠をのせ，枠を押えてパッキングとガラス板とを密着させ，ガラス板が冷却しないうちに，分注した加温検定用培地を枠内に流し，直ちにガラス板を持つて枠内の全面に拡げ，水平台の上におき，ガラス板で覆つて培地を固化させる。

培地を固化後 20 分してから cylinder をピンセットで 3cm 間隔に Fig. 2 に示した外側の一列を除いておき，横および縦の中央の行列にある 11 個の cylinder のなかにその縁に触れないように注意して修正用標準液 (0.01 mcg/cc) を 1cc の駒込ピペットで充す。充し方は cylinder の上縁迄加えるような操作が容易であるが，液量に僅かの不揃があつても阻止帯径には測定しえられる程の影響はみられない。次に供試抽出液を修正用標準液で囲まれた区域の6個の cylinder に駒込ピペットで充す。標準曲線を特別に求めるには，0.04, 0.02, 0.005 および 0.0025 mcg/cc の標準液を供試液の代りに置けばよい。しかし後述のような計算法をとるようにすれば，毎回標準曲線を求める必要はない。

cylinder を充し終れば，再び蓋をして室温に 30 分間放置した後に，30°C の孵卵器に収容する。この場合に孵卵器の棚が金網で作つてあると，ガラス板が棚の上を滑らないために，cylinder が動いて失敗することがある。従つて棚は小孔をあけたアルミ板に取換えた方がよい。30°C に 15～18 時間放置した後に取り出し，阻止帯径を Fig. 1 のような読みとり器の上で 0.5mm の精度で読みとる。1枚のガラス板に4種の供試抽出液がおいてあり，1種の供試抽出液について6個の阻止帯が得られているので，それぞれ各試料の6個の阻止帯径の平均値を算出する。また修正用 CTC 液 (0.01 mcg/cc) の 11 個の阻止帯径の平均値を算出する。これらの値を用いて次の方法のいづれかで組織中の CTC 量を求める。

阻止帯径から CTC 濃度への換算には標準曲線を測定の度に毎回作る必要はない。本定量法を特別に変改しない限りは，Table 3 の右欄に示した値を用いて回帰直線を求め，次に定量に用いた全部のガラス板上の修正用阻止帯径の平均値を通るように前記の回帰直線を平行にうつしたものを描く。この直線を用いて阻止帯径から CTC 濃度を求め，これに組織の抽出稀釈度を補正 (一般には ×5，特別に抽出液を稀釈して供試した時には更に稀釈度を補正) して組織中の CTC 量 (mcg/g 或は ppm) を算出する。但し各ガラス板上の修正用阻止帯径の間にかなりの変倚がある場合には，各個のガラス板上の修正用阻止帯径の平均値を通るようにうつしたものを各個に描き，各個のガラス板上の阻止帯径よりの換算に用いる。或はまた前記のような作図をしないで，回帰直線から求めた (1) 式を用いても換算できる。

$$C = D \times \text{antilog}\left(\frac{S-R}{12} - 2\right) \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

但し，
S = zone size (mm.) for a sample extract
R = zone size (mm.) for the reference (0.01 mcg/cc)
D = dilution factor
C = mcg. CTC/g. tissue

結果および考察

1. 同一 cylinder plate 上の阻止帯の分散

修正用標準液を Fig. 2 の十字の部分に置いた場合の同一 plate 内の分散を算出した結果は Table 1 に

Table 1. Variation in average of eleven zone sizes for 0.01mcg/cc. on several plates prepared at different dates.

no. of plate \ date	June 16	June 17	June 19	June 21	July 2
1	17.6 ± .44	17.8 ± .42	17.6 ± .31	17.3 ± .32	16.5 ± .41
2	18.0 ± .32	18.0 ± .55	17.2 ± .23	16.6 ± .31	16.4 ± .32
3	18.7 ± .47	17.7 ± .51	17.2 ± .23	16.8 ± .41	16.6 ± .39
4	18.8 ± .35	17.8 ± .35	16.5 ± .59	17.1 ± .54	16.8 ± .38
5	17.6 ± .50	17.4 ± .30		16.4 ± .32	16.3 ± .34
Ave. of different plates	18.1 ± .58	17.7 ± .22	17.1 ± .46	16.8 ± .36	16.5 ± .19
Ave. of mean zone size at dif. date			17.2 ± .65		

示した通りである。この分散は阻止帯の測定精度が 0.3～0.5 mm 程度であることを考慮にいれると，比較的に小さい。

ただしここに注意すべきことは，Fig. 2 にみられるように，周辺に近い位置の阻止帯が大きくなる傾向があるので，ここに使用した金属枠の大きさでは Fig. 2 に示した枠内しか定量にあてられない。

2. cylinder plate 間の阻止帯の分散

修正用標準液の阻止帯平均が plate によつてどのような分散を示すかによつて，同時に作つた各 plate 上の阻止帯を補正することがどの程度重要であるかが判断できる筈である。Tables 1 および 2 をみると明かなように，同時に作つた各 plate 間の分散は同一 plate 内の分散と近似している。即ち検定用培

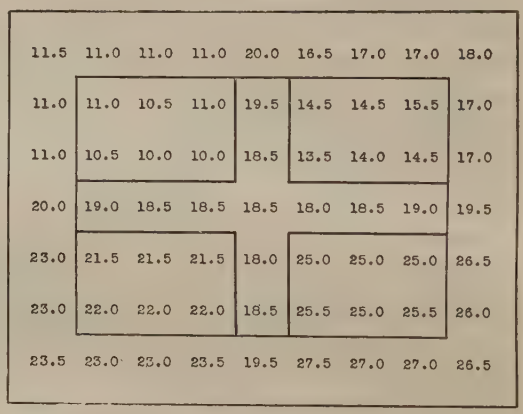


Fig. 2. A representative distribution pattern of inhibitory zone size (mm.) on a test plate

Table 2. Measured zone sizes (mm.) for a standard CTC series

mcg. per cc. \ date	June 14	June 16	June 17		June 19		June 21		July 2		Ave. ± std. dev.
0.04*	26.8 ±.52	25.3 ±.28	24.3 ±.26	24.5 ±.32	24.1 ±.20	23.7 ±.26	24.3 ±.42	23.7 ±.26	24.2 ±.26	23.6 ±.33	24.1 ±.96
0.02*	23.9 ±.50	21.8 ±.28	21.3 ±.27	21.8 ±.26	20.6 ±.38	20.7 ±.26	21.3 ±.41	21.3 ±.69	20.7 ±.41	20.2 ±.41	21.3 ±1.03
0.01§	20.2 ±.56	18.6 ±.44	18.2 ±.36	18.5 ±.27	17.8 ±.26	17.9 ±.37	17.5 ±.52	17.6 ±.23	17.3 ±.34	16.5 ±.41	18.0 ±.97
0.005*	15.8 ±.42	14.4 ±.67	14.8 ±.26	13.9 ±.67	13.8 ±.42	14.4 ±.67	13.7 ±.51	14.5 ±.45	14.0 ±.55	13.5 ±.42	14.3 ±.66
0.0025*	11.7 ±.61	10.2 ±.41	9.6 ±.38	10.0 ±.55	9.5 ±.50	10.1 ±.49	9.9 ±.58	10.6 ±.49	9.4 ±.33	9.0 ±.32	10.0 ±.75

* Average of six measurements. § Average of eleven measurements.

地の厚さ，培地を流した時間，供試抽出液を充した時間等が近似している限り各 plate 間の分散は小さいことが分る。但し平均値から 0.5mm 以上の差をもつ plate が見当れば，この差の補正は施さねばならない。

他方，異る日に検定した場合における阻止帯径の分散は Table 1 の最下行および Table 2 の右欄に示してあるようにかなり大きかつた。従つて次項に示すような方法を講ずるのでなければ，毎回標準曲線を作成する必要が生れてくる。

3. 標準曲線の必要性

前項で述べたように，異る時期に作つた標準液の阻止帯径はかなり分散していたので，補正用の 0.01 mcg/cc の阻止帯が同一となるように他の濃度の阻止帯をそれぞれ補正してみた。その結果は Table 3 に示すように，各濃度についての平均値からの分散はいづれの測定日においても大同小異であつた。それ故に Table 3 に示した 10 回の測定値の平均値を用いて CTC 濃度の対数値と阻止帯径との関係を示す回帰直線を求めると，(2) 式のようになる。

$$y - 17.6 = 11.95x \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

但し，　y = zone size (mm.)

$x = 2 + \log$ (mcg. CTC/cc.)

Table 3. Zone sizes (mm.) which were adjusted to give a zone size of 18.0mm. for the reference

date / mcg. per cc.	June 14	June 16	June 17		June 19		June 21		July 2		Ave. ±std. dev.	Calc. from regression line
0.04	24.6	24.7	24.1	24.0	24.3	23.8	24.8	24.1	24.9	24.9	24.42 ± .41	24.8
0.02	21.7	21.2	21.1	21.3	20.8	20.8	21.8	21.7	21.4	21.5	21.33 ± .32	21.2
0.01	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0		17.6
0.005	13.6	13.8	14.6	13.4	14.0	14.5	14.2	14.9	14.7	14.9	14.26 ± .54	14.0
0.0025	9.5	9.6	9.4	9.5	9.7	10.2	10.4	11.0	10.1	10.3	9.97 ± .52	10.4
slope	12.72	12.49	11.93	12.26	11.96	11.13	12.09	10.96	12.06	11.89	11.95 ± .53	

この直線の傾斜の信頼限界は 5% の危険率で 11.95 ± 1.22 であつた。各 plate 毎にえた標準直線の回帰直線の傾斜値は Table 3 の最下行にあげてある。異る日に求めた標準曲線の傾斜の平均値について信頼限界を求めると，1% の危険率で 11.95 ± 0.53 であるから，測定日が異つてもこの傾斜は比較的に一致していることが分る。

このような解析結果から判断すると，標準曲線は毎回求めなくともよいといえる。即ち 1 つの plate 上の修正用阻止帯径の平均値 R を求めれば，定量法の項で示したような方法で換算のための標準曲線が求められるし，或はまた回帰方程式 (1) が使用できる。この標準曲線或は式 (1) を用いれば，試料の阻止帯径から試料中の CTC 濃度を求めることができる。

いま CTC で処理した数種の魚類の組織抽出液について，CTC 含量への計算方法を常法のように定量の度毎に作つた標準曲線によつて求めた場合と回帰直線或は式 (1) によつて求めた場合とを比較対照してみると，Table 4 に示すように，両者のよい一致がみられた。

なお実験例が少いので，統計的な処理は困難であるが，アセトンを含まない M/50 クエン酸緩衝液 (pH 5.2) のみを抽出剤に用いた場合にも，Fig. 3 に示すように定量の感度が低下するだけで，傾斜は近似していた。

Table 4. A comparison between data for CTC-contents obtained by the routine method and the authors' method

Sample tissue	Ave. zone size, reference	Ave. zone size, sample ext.	Calculated by regular std. curve (routine method)		Calculated by regression line (present method)		Dilution factor
Salmon	mm.	mm.	mcg/cc	mcg/cg	mcg/cc	mcg/cg	
unskinned flesh	18.4	27.6	.056	.28	.059	.30	× 5
skinned outer flesh	18.4	24.8	.033	.17	.034	.17	× 5
skin	16.7	21.3	.025	2.63	.024	2.52	×105
tail flesh	16.7	19.1	.016	.08	.016	.08	× 5
gills	16.8	18.6	.014	.75	.014	.75	× 53.8
caudal fin	16.8	20.5	.021	3.80	.020	3.62	× 18.1
Squid							
flesh	17.6	18.7	.013	.39	.012	.36	× 30
Croaker							
skin	16.4	22.4	.031	.16	.032	.16	× 5
flesh	16.4	19.3	.017	.09	.018	.09	× 5
Mackerel							
skin	19.6	23.5	.022	.22	.021	.21	× 10
flesh	18.5	19.4	.012	.06	.012	.06	× 5

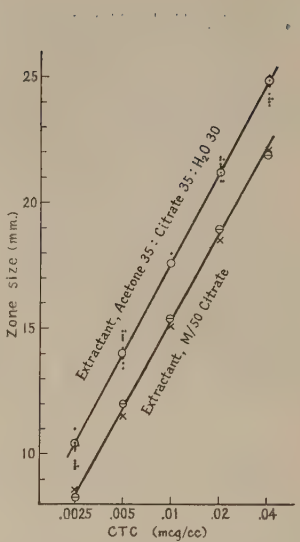


Fig. 3. Standard curves for acetone-containing extractant and aqueous extractant. The left curve represents the regression line.

摘　　要

1. 多数の試料中の CTC を定量するのに適当した簡易定量法を提案した。

2. 検定用シャーレの代りにガラス板に検定用培地を流すようにしたので，操作が極めて簡単になつた。

3. 同一ガラス板上の阻止帯の分散および各ガラス板の間の分散は互に近似していた。

4. 実験の期日を異にした阻止帯径の分散は前二者よりもかなり大であつた。

5. 実験の期日を異にした場合における標準曲線の傾斜の分散は小さかつたので，阻止帯径の大きさと CTC 濃度の対数値との関係を示す回帰直線を用いれば，阻止帯径から CTC 濃度への換算の目的で標準曲線を定量の度毎に作る必要のないことが分つた。

本研究には大山重信氏および北原慶子氏の助力をえた。また昭和 33 年度の文部省科学研究費および日本レダリー KK の援助によつて研究を遂行した。ここに特記して各位に謝意を表する。

文　　献

1-a) Grady, J. E. and Williams, W. L.: Antibiotics and Chemotherapy, **3**, 15 (1953). b) Broquist, H. P. and Kohler, A. R.: Antibiotics Annual (1953～1954) p. 409. c) Abbey, A., Darken, M. A., Kline, F. E., Kohler, A. R., Maturi, V. F., Miller, W. H. and Upham, S. D.: Antibiotics Annual (1956～1957) p. 831. d) Tomiyama, T., Yone, Y. and Mikajiri, K.: Food Technol., 11, 290 (1957). e) Abbey, A.: Technical Bulletin 1, Farm and Home Products-Cyanamid International-30 Rockefeller Plaza, New York 20, N. Y. (1957).

2-a) Grove, D. and Randall, A.: Assay methods of antibiotics, A laboratory manual (Antibiotics Monographs No. 2) p. 50～52, Medical Encyclopedia. Inc., New York, N. Y. (1955). b) Yamazaki, S., Nogi, M., Takahashi, S., and Umezawa, H.: J. Antibiotics, **10**, 87 (1957).

3) 富山哲夫・津田　厚・米　康夫: 本誌, **23**, 660 (1958).

4) 富山哲夫・津田　厚・米　康夫: 本誌, **24**, 289 (1958).

5) 緒方浩一: 未発表.

組織中のテトラサイクリンおよびオキシテトラサイクリンの簡易定量法

富山哲夫・大山重信

日本水産学会誌
第二十五巻 第三号 別冊
昭和三十四年七月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 3, July, 1959.

組織中のテトラサイクリンおよびオキシテトラサイクリンの簡易定量法*

富山哲夫・大山重信

(1959 年 4 月 27 日受理)

A PRACTICAL ASSAY METHOD FOR DETERMINATION OF TETRACYCLINE AND OXYTETRACYCLINE IN TISSUES

Tetuo Tomiyama and Shigenobu Ōyama**

Tomiyama et al[3] reported a practical assay method appropriate for the determination of minute amount of chlortetracycline (CTC) in tissues. The present study deals with the application of their method to the determination of tetracycline (TC) and oxytetracycline (OTC) in tissues.

It was found that the method could be applied for this purpose by only modifying the standard antibiotics solutions. The average recoveries of TC or OTC which was included in tissues were found 88% from muscle and 96% from skin. The minimum inhibitory concentration of TC or OTC was 0.006 mcg per cc., i.e., a detectable amount of OTC in tissues being 0.03 mcg per g. of tissue when one part of a sample tissue is extracted with four parts of the extractant. It was shown that the preparation of the standard curve at each determination could be omitted by employing the linear regression line just as in the case of CTC.

The optimum condition for the sporulation of test organism, *B. cereus* #213, has also been studied, since difficulty was frequently met in obtaining a high yield of spore of the test organism while none was experienced in case of *B. cereus* #5. Several trials revealed that both a suitable cell concentration of the inoculum and a moderately thin layer of the basal medium are required for efficient sporulation of the organism.

テトラサイクリン系の抗生物質のうちで医薬品として用いられているものにはクロルテトラサイクリン (CTC と略記), オキシテトラサイクリン (OTC と略記) およびテトラサイクリン (TC と略記) があり, 食品の保鮮の目的には前二者が用いられている。これら抗生物質のうちで CTC の定量法についてはすでに報告した[1,2,3]。OTC および TC の定量法としては, 主として純度の検定のための方法のみであつて, OTC は化学的方法[4], TC は microbioassay 法[4] によつている。

本報においては富山等[3]の提案した CTC の簡易 cylinder plate microbioassay 法がそのまま TC および OTC の定量に応用できるかどうかについて検討した。即ちその検定菌 *B. cereus* #213 のこれら抗生物質に対する感度, 標準曲線の再現性, 検定限界および回収率について検討した。その結果によると標準溶液の濃度を変えるだけで, この簡易定量法がそのまま TC および OTC の定量に応用できることが分つたので以下報告する。なお定量用の *B. cereus* #213 の胞子化がしばしば困難なことを経験したので, 胞子化の条件を検討した結果をも報告する。

実験材料および定量方法

1. 研究材料

本研究に使用した TC はレダリー KK の医薬用のものであり, OTC はファイザー KK の医薬用のもの

* 本研究の大要は 1958 年 10 月に日本水産学会九州支部大会 (鹿児島市) において発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem. Fac. Agr. Kyushu Univ.).

を用いた。検定菌 *B. cereus* #213 は American Cyanamid Co. の Princeton Laboratory の ABBEY 氏より分与されたものである。研究に使用した魚類の内，コイは活魚を用い，他の魚類はいずれも市場より求めたものである。

2. 定量方法

つぎに示す標準液の濃度を除いては，定量用の器具，組織抽出剤，稀釈剤，検定菌種，検定培地の組成および定量の操作は前報[3]と全く同じである。なお定量値の計算には次式 (1) を用いる。

$$\text{TC or OTC, mcg/g} = D \times \text{antilog}\left(\frac{S-R}{12} - 1.301\right) \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

但し D = dilution factor. When sample tissue is extracted with the extractant four times as much as tissue weight, D must be 5.

S = zone size (mm) for sample extract.

R = zone size (mm) for reference solution (0.05 mcg/cc) of TC or OTC.

TC および OTC の標準液の調製：TC 塩酸塩或いは OTC 塩酸塩の結晶 100.0 mg を蒸溜水にとかし，100 cc に定容する。この 2cc 宛を小型試験管に分注し，ポリエチレン膜で蓋をして凍結保存する。

この原液 2cc から標準液の系列をつくるには，pH 5.6 の稀釈剤を用いて 100 cc とし，つぎにこの 1cc を 100 cc にする。この液は 0.2 mcg/cc に当るので，これを順次に 2 倍ずつに稀釈して 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 および 0.0125 mcg/cc と 5 段階をつくり，標準曲線を求めるのに用いる。各 plate 毎の阻止帯の大きさを修正するには 0.05 mcg/cc のものをあてる。

研究結果

1. 検定菌の胞子化の条件

検定菌 *B. cereus* #213 の胞子化には時々失敗を経験したので，胞子化率の向上について吟味してみた。胞子化率の測定には加熱処理で繁殖細胞を滅菌した後に，胞子のみを平板培養して測定する方法も試みてみたが，再現性のある値がえられなかつたので，位相差顕微鏡下の観察により胞子化の概略を読みとる方法によつた。その結果は Table 1 に示したように，接種菌の濃度が甚だしく稀薄な場合および濃厚な場合には 10 日間内の胞子化がいずれも不完全であつた。さらにこれよりも影響が著るしいのは Table 2 に示したように，培地の層の厚さであつて厚い場合には胞子化率が著るしく低下した。

Table 1. Change in percentage of sporulation of *B. cereus* #213 with its inoculated vegetative cell concentrations.

% light transmission (660 mμ) of inoculum suspension	% sporulation* after inoculation at 30°C. for period of 4-day	7-day	10-day	std. dev.
1	1	5	10	± 9.4
	1	5	10	± 9.4
4	10	40	60	± 12.9
	20	50	70	± 9.4
13	10	40	70	± 12.4
	5	10	20	± 11.5
	20	40	70	± 15.2
23.5	10	20	30	± 12.0
	20	40	70	± 10.5
	30	60	80	± 12.4
49	10	40	50	± 11.0
	20	50	70	± 9.4
67.5	10	40	70	± 10.0
	10	20	40	± 14.5
90.5	5	10	20	± 15.2
	10	—	—	

* Since the vegetative cells were found not in separated but in conjugated form, 10 to 20 countings of about ten cells were made in each microscope field, and data for several different fields were averaged.

Table 2. Effect of thickness of medium on sporulation of *B. cereus* #213.

Vol. of medium added to 400cc Roux flask	% sporulation after incubation at 30°C. for period of 5-day	10-day
100 cc.	0	10
	0	5
	0	5
50 cc.	50	90
	40	80
	20	70

2. CTC, TC および OTC に対する検定菌の感度

同時に作つた CTC, TC および OTC の標準曲線を Fig. 1 に示す。この図から明らかなように，検定菌の TC および OTC への感度は CTC への感度の約 1/5 であつた。また Table 3 をみると分るように pH 5.6 の移釈剤中にとけた TC および OTC の示す感度および標準曲線の勾配は，筋肉や皮の抽出液にそれぞれ同量の TC 或いは OTC を添加した場合の感度および勾配とほとんど差がみられなかつた。したがつて pH 5.6 の稀釈剤で5段階の濃度にとかした TC 或いは OTC の標準液によつて標準曲線を作り，これを用いて組織抽出液の濃度を決定しても誤差は起らない。

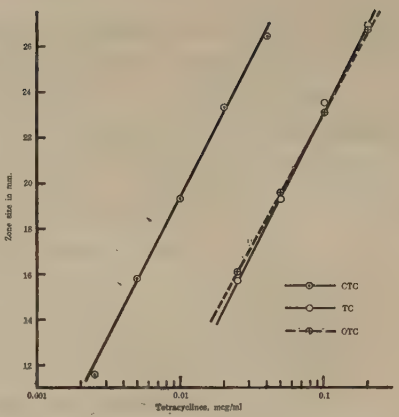


Fig. 1. Comparative susceptibility of *B. cereus* #213 to TC, OTC, and CTC.

Table 3. Zone sizes for TC and OTC with or without tissue extract.

	Spec. of fish	With or without tissues	Inhibitory zone size (mm.) at antibiotics conc. (mcg/cc) .0125	.025	.05	.1	.2	Slope of curve
TC	Carp*	with skin	—	15.5	19.5	22.8	26.6	12.1
		without	11.3	15.7	18.8	33.4	26.3	12.0
		difference		− 0.2	+ 0.7	− 0.6	+ 0.3	
		with flesh	—	15.7	18.6	22.8	26.0	12.0
		without	10.7	15.1	18.2	22.8	25.7	12.0
		difference		+ 0.6	+ 0.4	0	− 0.3	
OTC	Carp*	with skin	—	16.5	19.6	23.5	26.8	11.6
		without	11.4	15.7	19.7	23.4	26.7	12.2
		difference		+ 0.8	− 0.1	+ 0.1	+ 0.1	
		with flesh	13.4	16.4	20.3	22.9	26.5	11.2
		without	13.5	17.2	20.3	23.9	27.0	11.2
		difference	− 0.1	− 0.8	0	− 1.0	− 0.5	
	File fish†	with flesh	11.1	15.0	18.4	21.9	25.0	11.0
		without	11.0	15.2	18.6	22.2	25.6	10.8
		difference	+ 0.1	− 0.2	− 0.2	− 0.3	− 0.6	

† *Stephanolepis cirrhifer.* * *Cyprinus carpio.*

3. 標準曲線の回帰方程式の決定および検出の最低限界

定量の度毎に標準曲線を求めることは繁雑であるだけでなく，何等かの原因で標準曲線に失敗があると，その時の定量値の計算ができなくなる。したがつて真に近い曲線を別に求めておいて，定量に当つて各 plate 毎の修正用 0.05 mcg/cc の示す阻止帯を前記の真に近い標準曲線上の 0.05 mcg/cc の阻止帯経に合致するように補正して計算すれば，誤差も少ない筈である。この企ては CTC の場合にも成功したので，TC や OTC の場合にも同様に取扱えるかを知るために，異なる日に作つた 10 筒の標準曲線を用いて回帰方程式を求めてみた。その資料は Tables 4 および 5 に示す通りで，これからつぎのような回帰方程式がえられた。

$$y - 19.0 = 12.23x \quad \cdots\cdots(2)$$

$$y - 19.8 = 11.86x \quad \cdots\cdots(3)$$

但し，(2) 式は TC, (3) 式は OTC のものである。ここに y = Inhibitory zone size in mm, $x = 1.301 + \log(\text{mcg/cc})$. TC の回帰線の勾配の 95% および 99% の信頼限界はそれぞれ 12.23 ± 0.17 および 12.23 ± 0.25, OTC の場合にはそれぞれ 11.86 ± 0.47 および 11.86 ± 0.68 となる。2つの回帰線の勾配の差は僅少であるから，CTC の場合と同様に 12 として阻止帯経の大きさから濃度 (mcg/cc) に換算の

Table 4. Adjusted inhibitory zone sizes (mm.)* for TC standard solution.

Date / mcg. per cc.	Oct. 15	〃 16	〃 17	〃 18	〃 18	〃 23	Nov. 1	〃 3	〃 3	〃 3	Ave. ± std. dev.	Calc. from regression line
0.0125	12.1	11.9	11.7	12.0	12.2	11.4	11.2	11.3	11.3	11.2	11.63±0.39	11.6
0.025	15.8	14.7	15.9	14.9	15.8	15.6	15.0	15.4	15.3	15.2	15.36±0.42	15.3
0.05	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0
0.1	22.7	23.2	23.6	22.7	23.2	22.6	22.4	22.0	22.6	22.8	22.78±0.45	22.7
0.2	26.6	26.6	26.4	26.4	26.6	26.0	26.5	26.3	25.8	25.9	26.31±0.37	26.4
slope	11.93	12.61	12.34	12.16	12.03	12.03	12.62	12.16	12.06	12.29	12.23±0.24	

* Zone sizes (mm.) which were obtained by adjusting measured zone sizes to make measured reference zone sizes 19.0 mm.

Table 5. Adjusted inhibitory zone sizes (mm.)* for OTC standard solution.

Date / mcg. per cc.	Oct. 18	〃 23	〃 25	〃 27	〃 28	〃 31	Nov. 4	〃 5	〃 5	〃 5	Ave. ± std. dev.	Calc. from regression line
0.0125	11.9	13.4	12.3	12.6	12.3	12.6	12.5	12.0	12.4	12.1	12.41±0.42	12.6
0.025	16.9	16.6	16.5	16.1	16.8	17.1	16.5	15.4	15.9	16.5	16.43±0.51	16.2
0.05	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	19.8
0.1	23.7	23.2	23.2	23.6	23.2	23.1	23.3	23.6	23.7	23.9	23.45±0.28	23.4
0.2	27.0	26.2	25.7	27.3	26.7	26.8	26.5	27.2	27.0	27.1	26.75±0.50	26.9
slope	12.29	10.70	11.13	12.26	11.69	11.43	11.56	12.83	12.29	12.42	11.86±0.66	

* Zone sizes (mm.) which were obtained by adjusting measured zone sizes to make measured reference zone sizes 19.0 mm.

Table 6. Comparison between values for TC or OTC obtained by standard curve and regression line.

Kinds of tetracyclines	Sample tissue		Ave. zone size, reference	Ave. zone size, sample ext.	Calculated by: regular std. curve (routine method)		Calculated by: regression line (present method)	
			mm.	mm.	mcg/cc	mcg/g§	mcg/cc	mcg/g§
OTC	carp*	muscle	21.2	23.7	0.084	0.42	0.081	0.41
OTC	"konosiro"††	muscle	20.2	22.7	0.082	0.41	0.081	0.41
OTC	"konosiro"††	muscle	20.0	22.6	0.083	0.42	0.082	0.41
OTC	"konosiro"††	muscle	19.7	15.4	0.022	0.11	0.022	0.11
OTC	"konosiro"††	skin	20.3	23.2	0.086	0.43	0.088	0.44
OTC	"konosiro"††	skin	20.0	19.2	0.043	0.22	0.043	0.22
OTC	mullet**	muscle	20.2	23.0	0.086	0.43	0.086	0.43
OTC	mullet**	muscle	20.0	22.9	0.088	0.44	0.087	0.44
OTC	mullet**	muscle	19.7	15.0	0.021	0.11	0.020	0.10
OTC	mullet**	skin	19.3	19.6	0.053	0.27	0.053	0.27
OTC	mullet**	skin	19.3	19.8	0.055	0.28	0.055	0.28
TC	carp	muscle	20.8	23.3	0.080	0.40	0.081	0.41
TC	"konosiro"††	muscle	20.6	23.9	0.096	0.48	0.094	0.47
TC	"konosiro"††	muscle	18.6	21.8	0.094	0.47	0.092	0.46
TC	"konosiro"††	muscle	18.8	14.4	0.022	0.11	0.021	0.11
TC	"konosiro"††	skin	19.0	22.3	0.090	0.45	0.094	0.47
TC	"konosiro"††	skin	19.5	19.7	0.051	0.26	0.052	0.26
TC	mullet**	muscle	20.6	23.4	0.087	0.44	0.086	0.43
TC	mullet**	muscle	18.6	21.2	0.082	0.41	0.082	0.41
TC	mullet**	muscle	18.8	14.3	0.021	0.11	0.021	0.11
TC	mullet**	skin	19.5	19.3	0.048	0.24	0.048	0.24
TC	mullet**	skin	19.5	18.9	0.044	0.22	0.045	0.23

§ tissue : extractant = 1 : 4 * *Cyprinus carpio.* ** *Mugil cephalus.*
†† *Konosirus punctatus.*

ための略算式を求めると次式 (4) がえられる。

$$C = \text{antilog}\left(\frac{S-R}{12} - 1.301\right) \cdots\cdots (4)$$

但し, C = mcg/cc, S = zone size (mm) of sample extract, R = zone size (mm) of reference solution (0.05 mcg/cc) of TC or OTC.

実際に測定した阻止帯経の値から上式 (4) によつて計算した結果とそれぞれの定量の時に設けた標準曲線を用いて計算した結果とを対比すると Table 6 にみられるように, よく一致している。それ故に測定の都度, 標準曲線をつくらなくとも, 予め阻止帯経と濃度との関係を示す回帰直線或いは方程式を作つておけば定量値への換算ができる。

次に上記の回帰直線を外挿して検定の最低限界値を求めてみると, いずれも 0.006 mcg/cc となり, 組織1を抽出剤4で抽出した場合には, 組織中の検定限界濃度はいずれも 0.03 mcg/cc となる。勿論この限界値では定量の誤差は甚るしく大きいが, 本抽出剤を用いると山崎氏等の方法[8]のように低濃度範囲が直線から偏倚することはないので, 定量限界附近の低濃度を回帰方程式から求めた値の信頼性は高い。但しこの限界値はガラス板に流した寒天の厚さによつて変動することは注意すべきである。しかしあまり薄い層の培地を用いるとガラス板の位置による不均一が大きくなり, また均一の培地を流し難いので, 誤差が大きくなる。

Table 7. Recovery of TC and OTC from tissues to which known amounts of the antibiotics were added.

Sample tissue		included	OTC reco-vered	OTC recovery	OTC recovery ave.	TC reco-vered	TC recovery	TC recovery ave.
		mcg/g	mcg/g	%	%	mcg/g	%	%
"Konosiro"	muscle	0.500	0.410	82		0.480	96	
			0.490	98	88	0.470	94	94
			0.415	83		0.470	94	
		0.125	0.095	76				
			0.105	84	84	0.118	94	89
			0.110	88		0.110	88	
			0.108	86		0.108	86	
	skin	0.500	0.430	86		0.480	96	
			0.500	100	91	0.490	98	97
			0.440	88		0.455	91	
		0.250	0.215	86		0.260	104	
			0.250	100	95	0.250	100	102
			0.250	100		0.255	102	
Mullet	muscle	0.500	0.430	86		0.435	87	
			0.470	94	89	0.470	94	88
			0.440	88		0.410	82	
		0.125	0.095	76				
			0.103	82	81	0.105	84	
			0.103	82		0.105	84	84
			0.103	82		0.105	84	
	skin	0.250	0.250	100		0.250	100	
			0.265	106	105	0.240	96	95
			0.275	110		0.220	88	
Carp	muscle	0.500	0.420	84				
			0.450	90	89	0.460	92	91
			0.470	94		0.450	90	
		0.125	0.113	90	91	0.113	90	87
			0.115	92		0.105	84	
	skin	0.500	0.437	87	91	0.435	87	91
			0.472	94		0.470	94	

4. TC および OTC の回収率

数種の魚類の筋肉および皮をよく擂砕し, これらに一定量の TC 或いは OTC を添加し, これを 4 倍量のクエン酸緩衝液 (pH 5.2)・アセトン混液で抽出して, それぞれの回収率を求めた結果は Table 7 に示すようである。すなわち TC の回収率は筋肉では 88.8 ± 3.4% (標準偏差), 皮では 95.5 ± 4.6% であり, OTC の回収率は筋肉では 87.0 ± 3.7%, 皮では 95.5 ± 6.7% であつた。

考　　察

組織中の CTC の定量法において従来用いられていた抽出剤, すなわち, 塩酸・アセトン混液をクエン酸緩衝液・アセトンに変えると回収率が良くなり, 操作が簡単になることについては前報[1,2,3]において報告

した。これらの方法は米国の FDA の方法[4]，American Cyanamid Co. の方法[5]，山崎・野木・高橋・梅沢法[6] 等よりも操作の簡易な点や回収率の高い点で優つている。

特に富山等の簡易法[3] が TC および OTC の定量にそのまま適用しえられることは本研究で明らかにされた。TC および OTC に対する検定菌の感度は CTC に対する感度の約 1/5 である点では，将来より感度の高い検定菌を検索する必要を残している。本法による TC 並びに OTC の回収率は 87～96% であつて，米国で用いられている CTC の定量法における回収率が 0.1 mcg/g の場合 45%，0.25 mcg/g の場合 58%，0.5 mcg/g の場合 72% であるのに比べると，満足すべき値である。

本法における簡易化の重要な点は CTC の場合と同様に，標準曲線を毎回作るのを省略できたことである。もし標準曲線が従来の方法[1,5,6]のように組織抽出物の存在によつて変動するのであれば，毎回試料と近似し抗生物質を含まない組織の抽出液を用いて標準曲線を画かねばならない。しかし本法では組織抽出物の存在は標準曲線を変動させることがないので，標準曲線を毎回作らずにその回帰方程式を用いて換算することが可能となつた。したがつてこの簡易定量法によると，1人で1日に最少 20 個の試料の定量は容易であるから，食品におけるテトラサイクリン類の残存量の調査研究には極めて都合がよい。勿論この方法では CTC と OTC とを区別定量することはできないので，両者を混用した場合のそれぞれの組織中の残存量は求めえない。

なお本定量法には *B. cereus* #5 でなく #213 の胞子を用いたが，#5 の胞子化は容易であるのに対し #213 では，しばしば胞子化に失敗することを経験した。その原因の1つとしては培地の厚さが非常に重要であることが示された。これは一般に信せられているように培地の栄養成分が消耗されてから胞子化することを意味する。また接種菌の濃度が著るしく稀薄か或いは濃厚な場合に胞子化が不完全なことからみると，胞子化には菌の世代数と培地の栄養欠乏との或る適当な条件が必要かと推察される。

総　　括

1. 組織に含まれる微量の TC および OTC は CTC の定量に用いた簡易 cylinder plate 法によつて定量できる。

2. 検定菌の胞子化には接種菌量が適当であること，また培地の厚さが薄いことが必要である。

3. 定量しえられる最低濃度はいずれも約 0.03 mcg/g である。

4. TC 或いは OTC の濃度の対数値と阻止帯経との関係を示す回帰直線の勾配はいずれも近似しているので，標準曲線を定量の度毎に作成する必要はない。

5. TC および OTC の筋肉および皮からの回収率はいずれもそれぞれ平均 88% および 96% であつた。

本研究は昭和 33 年度文部省科学研究費により遂行した。また日本レダリーからは抗生物質および定量装置について援助をえた。ここに記して謝意を表する。

文　　献

1) 富山哲夫・津田　厚・米　康夫：本誌，**23**，660 (1957).
2) 富山哲夫・津田　厚・米　康夫：本誌，**24**，289 (1958).
3) 富山哲夫・小林邦男・米　康夫：本誌，**24**，937 (1959).
4) GROVE, D., and RANDALL, A.: Assay Methods of Antibiotics, A Laboratory Manual (Antibiotics Monographs No. 2) Medical Encyclopedia. Inc., New York, N. Y. (1955).
5) ABBEY, A.: Modified Microbiological Procedure for the Evaluation of Acronized Processed Products. Farm and Home Products—Cyanamid International—30 Rockefeller Plaza, New York, 20, N. Y.
6) YAMAZAKI, S., NOGI, M., TAKAHASHI, S., and UMEZAWA, H.: *J. Antibiotics*, **10**, 87 (1957).

食品の鮮度測定法に関する研究—X.
太田氏のヒスタミン定量法の誤差について*

津田 厚・森 健児・富山哲夫

(1959 年 5 月 19 日受理)

STUDIES ON THE METHOD FOR TESTING THE SPOILAGE OF FOOD—X.
ERRORS INVOLVED IN OTA's METHOD FOR DETERMINATION OF HISTAMINE

Atsushi Tsuda, Kenji Mori and Tetuo Tomiyama**

The chemical estimate of fish freshness is not always in accord with the organoleptic observation. Tomiyama et al[1] showed that the histamine (Hm) content of sardine flesh ran parallel with the organoleptic grade. A prerequisite for the study on the applicability of this objective test to judge quality of mackerel is to devise an appropriate practical method for the determination.

Ota[4] reported a practical method in which he employed *p*–nitrobenzene diazonium ion (*p*–NBD) as diazotizing reagent and ethyl acetate as extractant of Hm azo-pigment. However, when Hm determination of mackerel flesh was made by this method in our laboratory, it was found that high Hm values were always obtained on fresh fish extract and that the absorption spectrum of the Hm azo-pigment from a pure Hm solution was different from that prepared from Hm in the presence of flesh extract.

The present paper deals with the improvement of the Ota's method by removing interfering substances with Amberlite IRA–400 (OH–form) and introducing nitrous acid treatment prior to diazotization. Data herein presented revealed that (1) a maximal formation of the Hm pigment occurs at a pH range of 9 to 9.5, (2) the determination is greatly interfered by the presence of various amino acids in flesh extract and mechanism of the interference involved is due to consumption of *p*–NBD by amino acids giving an orange pigment, and (3) the interfering substances can be eliminated by percolating a trichloracetic acid extract of sample flesh through Amberlite IRA–400 (OH–form) leaving Hm in effluent, histamine being adsorbed on Amberlite IRC–50 and eluted with 0.2N HCl, followed by the nitrous acid treatment and coupling with *p*–NBD.

魚肉の化学的な鮮度測定法として用いられている揮発性塩基や pH 等の値は官能検査と一致しない場合がしばしばある。特にサバ肉では官能検査によつて腐敗と認められないに拘らず Histamin (Hm と略記する) の生成が起つている場合がある。生きた動物の筋肉中の Hm は零あるいは痕跡であるから，約 1mg·% 以上存在した場合には，その筋肉は Hm 生成菌によつて汚染されていると見做されるであろう。富山等[1] はサバおよびウルメイワシの鮮度低下と筋肉の Hm 量とが平行することを明かにした。

鮮度判定法として Hm の値を用いるためには，Hm の簡易定量法を工夫する必要がある。従来用いられた bioassay 法[2] は不正確かつ繁雑であり，cotton acid succinate 法[3] は回収率が低い欠点がある。太田氏[4] は最近 Hm の簡易比色定量法を発表したので，著者等はサバ肉中の Hm の定量にこの方法を適用し

* 本研究の大要は 1959 年 4 月 3 日の日本水産学会年会（東京都）において発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ., Fukuoka).

てみた。その結果ではサバ肉中にはこの定量法を阻害する物質が存在し，正確な Hm 値がえられないだけでなく，鮮度低下の初期に生ずる微量の Hm の定量は不可能であることを明かにしたので，それらの検討した結果を報告する。

研 究 結 果

1. 発色と pH との関係

魚肉抽出液中の Hm を太田氏法で発色すると，一定した色度および色調がえられなかつた。発色する時の pH の変動がその一因ではないかと想像して検討してみたところ，Fig. 1 に示すように pH 9 から 9.5 の間で発色度が最高，その前後では低下することが分つた。したがつて魚肉抽出液の場合にはヂアゾ化の前に pH 9 まで中和すべきである。

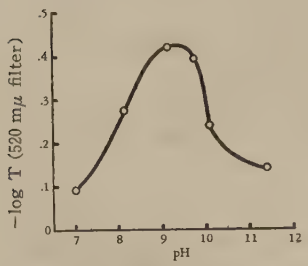


Fig. 1. Effect of pH upon formation of Hm azo-pigment.

また酢酸エチルに移した Hm 色素が赤紫色から赤橙色に褪色しやすいことをしばしば経験した。これは酢酸エチルが一部水解し pH を低下させたためと考え，アンモニヤを添加してみた。Table 1 から明かなように，これにより呈色度は約 9% 高くなり，吸収曲線は 540 mμ に鋭い極大を示すようになつた (Fig. 2)。また呈色も 10 分後では褪色せず，たとえ長時間放置して褪色したものもアンモニヤ添加で初めの呈色に回復した。

Table 1. The atability of histamine azo-pigment with and without addition of ammonia§

addition of ammonia		−log T at time of standing (min.)				
		0	10	20	30	60
*	no NH_3	.247	.240	.234	.232	
	+ NH_3	.270	.268	.260	.246	.238 (272†)
**	no NH_3	.265	.263	.260	.260	
	+ NH_3	.286	.285	.285	.282	

§ NH_3 was added to ethylacetate solution. * No nitrous acid treatment was made, i. e., original OTA's method. ** The nitrous acid treatment was applied prior to diazotization. † A value obtained on the second addition of NH_3.

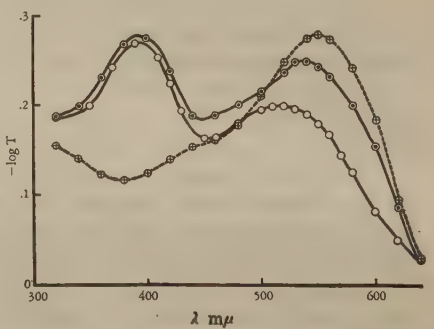


Fig. 2. Effect of addition of ammonia on absorption spectra of Hm azo-pigment. Hm azo-pigment, –○—○–; Hm azo-pigment with addition of NH_3, –⊙—⊙–; deaminized Hm azo-pigment with addition of NH_3, ·⊕··⊕·.

2. 魚肉抽出液の成分による定量の阻害

Hm を含まない新鮮なサバの肉抽出液，それに 50 mcg/cc になるように Hm を加えた液，および 50 mcg/cc の純 Hm 溶液を太田氏法で発色させると，Fig. 3 にみられるように抽出液中の Hm の発色は純 Hm の発色に比べて著るしく低く，それらの吸収曲線は 500 mμ 附近に吸収極大をもつているが，互に一致しない。Hm を含まないサバ肉抽出液では橙色の発色を示し，吸収曲線は 400 mμ 附近に極大があり，長波長側に長く裾を引いている。

このような定量を阻害する肉エキス成分はアミノ酸およびアンモニヤではないかと考え，モデルとして Alanin, Glutaminat および $(NH_4)_2SO_4$ の 0.1% 溶液に Na_2CO_3 のアルカリ性で *p*–Nitrobenzoldiazonium 試薬 (*p*–NBD と略記) を加えると，酢酸エチル可溶の橙色色素を生じ，Alanin および Glutaminat のアゾ色素は 400 mμ に，$(NH_4)_2SO_4$ のそれは 360 mμ に吸収極大をもち，いずれも長波長側に裾を引く吸収曲線を示した (Fig. 4)。

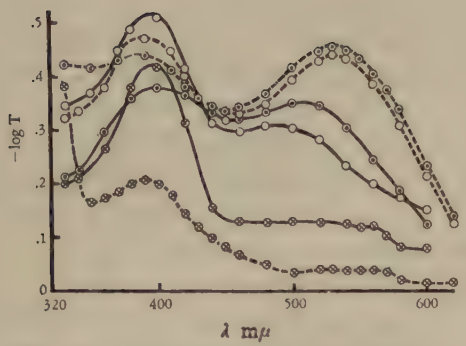


Fig. 3. Absorption spectra of Hm azo-pigments with and without HNO_2 treatment. The treatment of samples with HNO_2 was made prior to the color development. No treatment: Hm, 50 mcg/cc, –⊙—⊙–; flesh extract of mackerel plus Hm, 50 mcg/cc, –○—○–; flesh extract alone, –⊗—⊗–. Treated with HNO_2: Hm, 50 mcg/cc, –⊙—⊙–; flesh extract of mackerel plus Hm, 50 mcg/cc, ·○··○·; flesh extract alone, ·⊗··⊗·.

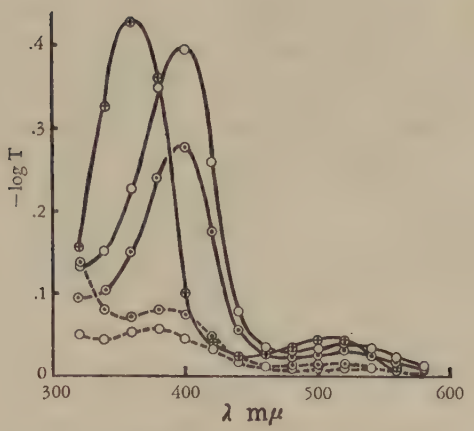


Fig. 4. Absorption spectra of pigments formed on addition of *p*-NBD to alanine, glutamic acid and ammonium sulfate, each concentration being 1 mg/cc. No treatment with HNO_2: alanine, –⊙—⊙–; glutamic acid, –○—○–; $(NH_4)_2SO_4$, –⊕—⊕–. Treated with HNO_2: alanine, ·⊙··⊙·; glutamic acid, ·○··○·.

3. 亜硝酸処理による定量阻害物質の除去

以上の検討から定量を阻害する原因の一部は供試抽出液中のアミノ酸であることが分つたので，*p*–NBD を加える前に N–HCl と 15% $NaNO_2$ をそれぞれ 0.5cc づつ加え，40°C に 5 分間反応させて脱アミノ化を行つてみた。その結果は肉抽出液に加えた Hm の呈色は同量の純 Hm の呈色とほぼ等しくなり，測定前にアンモニヤを加えない場合の λ_{max} は 530 mμ であり，両者とも一致した。他方，Hm を含まないサバ肉抽液を亜硝酸処理すると，400 mμ の吸収が著しく減少し，530 mμ 附近の吸光度も 40% 位に減少した (Fig. 3)。なお亜硝酸処理した Hm のアゾ色素の酢酸エチル溶液にアンモニヤを添加すると，呈色は 8% 増加し，λ_{max} は 550 mμ に移るので，阻害物質の影響を少くすることができた (Fig. 2)。

Hm, Histidin およびサバ肉抽出液を亜硝酸処理した場合に，ヂアゾ反応およびニンヒドリン反応がどのように変るかを沪紙クロマト法でブタノル: 酢酸: 水=4: 1: 1 により展開し，沪紙上で検出反応させて検索してみた。Hm および Histidin は亜硝酸処理によつてニンヒドリン反応陰性となるが，ヂアゾ反応は陽性で変らず，Rf 値はいずれも大きくなつている (Table 2)。Hm はこの処理によつて脱アミノ化されたことが明かである。Histidin およびサバ肉抽出液は亜硝酸処理によつて Hm と同じ Rf のスポットを与えなかつたことは注目される。なお Uracil, Thymin, Adenin, Guanin および Xanthin は亜硝酸処理後にヂアゾ化すと，いずれも赤色となるが，酢酸エチルには移行しなかつた。

Table 2. The paper chromatogram of histamine, histidine and mackerel flesh extract with and without nitrous acid treatment.

	no treatment			with treatment		
	histidine	flesh ext.	histamine	histidine	flesh ext.	histamine
ninhydrin reaction	+	+	+	−	−	−
diazo reaction	+	+	+	+	+	+
Rf	0.09	0.09	0.12	0.27	0.27	0.48

4. Amberlite IRA–400 による定量阻害物質の除去

Hm はかなり強い塩基性 (pk ≒ 4) をもつているから，アニオン交換樹脂には吸着されないはずである。

これを利用してアミノ酸類から分離することを試みた。すなわち Amberlite IRA-400 の OH 型 10cc を詰めたカラムを上部におき，IRC-50 の H 型 2cc を詰めたカラムを下部におき，肉の三塩化酢酸抽出液の 10cc を上部のカラムに通し，排出液と洗液とを下部のカラムに通して Hm を IRC-50 に捕集し，最後に IRC-50 の層から 0.2N HCl の 10cc で Hm を溶出した。溶出液を濃縮し沪紙クロマトにかけて Hm の分離精製の程度を検討してみたところ，この溶出液には Histidin, Tyrosin その他のアミノ酸は全く検出されず，ヂアゾ反応陽性物質は Hm だけであつた。

Table 3. Comparison between histamine values obtained by some relevant methods and the improved methods.

Quality of mackerel muscle	histamine content (mg·%)			
	OTA's method	cotton acid succinate method	HNO_2-treated§	HNO_2-treated† Amberlite IRA-400,
Fresh	45	28	12	0.6
Putrid	136	—	71	64
do.	140	272	230	212

§ The nitrous acid treatment was applied prior to diazo-coupling procedure in the OTA's method. † The nitrous acid treatment was made on the effluent from Amberlite IRA-400 prior to the diazo-coupling according to the OTA's procedure.

新鮮なサバおよび腐敗したサバの肉抽出液を前記のようにイオン交換樹脂を用いて測定した値を太田氏法，その改良法および cotton acid succinate 法による値と比較した結果は Table 3 に示してある。Hm の少いサバ肉抽出液では，太田氏法が甚だ大きく，これに反し亜硝酸処理をした場合，イオン交換樹脂と亜硝酸処理とを併用した場合はいずれも小さい値を示した。イオン交換樹脂を通した場合の Hm の回収率は 100% に近かつたので，これを用いない方法の値はいずれも阻害物質の発色によつて過大となつたことが明かである。腐敗したサバ肉抽出液についての定量値は太田氏法値の方が小さく，亜硝酸処理のみの値およびこれとイオン交換樹脂とを併用した時の値はいずれも大きいが，この両者はかなりよく一致した。腐敗した肉抽出液では，多量のアミノ酸が *p*-NBD 試薬を消耗したことが太田氏法値を小さくした原因であろう。cotton acid succinate 法は試料の鮮度の如何を問わず，イオン交換樹脂を用いた時より高い値を示した。サバ肉抽出液から Hm をイオン交換樹脂で分離し，亜硝酸処理後に発色させ，アンモニヤを加えてから測定した Hm アゾ色素の吸収曲線は阻害物質による 400 mμ の吸収が著しく小さくなり，また純 Hm を亜硝酸処理後発色させた吸収曲線と完全に一致した (Fig. 5)。

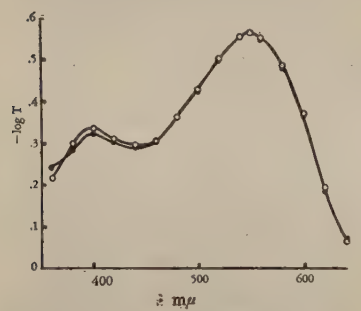


Fig. 5. Absorption spectra of diazotized Hm with or without presence of mackerel flesh extract. Hm, 40 mcg/cc, –○—○–; Hm, 40 mcg/cc plus flesh extract, –●—●–. Before coupling of Hm with *p*-NBD was made, the interfering substances were removed with Amberlite IRA-400, followed by treating with HNO_2.

5. Hm と *p*-NBD との反応比

PAULY[5)6)] は Histidin の Imidazol 核に 2 分子の *p*-Sulfobenzoldiazonium 塩が附加することを報告している。著者等はサバ肉抽出液が *p*-NBD を消耗することを知つたので，Hm と *p*-NBD との反応モル比について研究した。Hm のアミノ基を除くために予め亜硝酸処理を施した Hm の 0～5.44 micromol/cc の液を作り，その各 1cc づつをとり 7.1micromol/cc (0.1%) の *p*-NBD の 1cc に加えて反応させ，発色が最大になる濃度を求めた。Fig. 6 にみられるように，発色は Hm の 3.4 micromol で最大となつた。すなわち脱アミノ Hm の 1mol と *p*-NBD の 2mol が couple したことになる。Hm が 3.4 micromol 以上になると，Hm と *p*-NBD とが 1mol づつ反応した生成物が混合する筈である。この 1: 1 の反応比の色素は 400 mμ に極大をもつ赤橙色であることは Fig. 7 に示されている。アミノ酸の多い肉抽出液を太田比法で発色させたものには，Hm: *p*-NBD = 1: 1 の生成物の呈色が明かに認められるので，原法では試薬が不足していると断定できる。

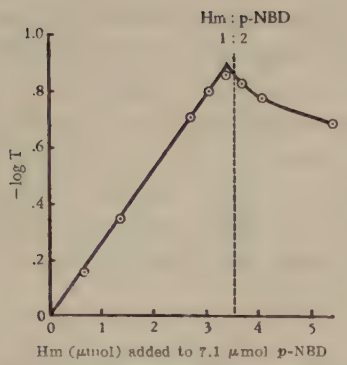


Fig. 6. Change in absorbance at 550 mμ with varying mol ratios between Hm and *p*-NBD. The pigments formed are measured after 1 : 10 dilution of ethyl acetate extract.

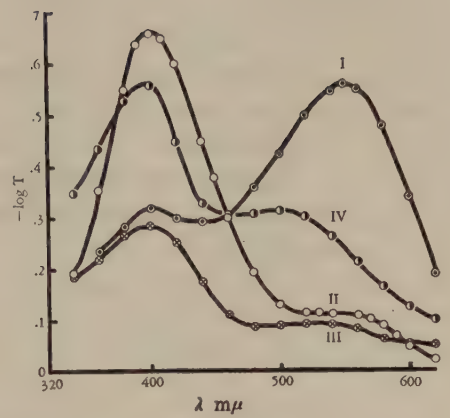


Fig. 7. Absorption spectra of two Hm pigments. I: product from 1 mol Hm and 2 mols *p*-NBD. II: product from 1 mol Hm and 1 mol *p*-NBD. III: fresh flesh extract alone treated according to OTA's procedure. IV: fresh flesh extract plus Hm treated according to OTA's procedure. Shortage of *p*-NBD apparently occurred in OTA's procedure.

考　　察

本研究の結果から解析すると，太田氏法における誤差の原因はつぎの4つに分類できる。(1) ヂアゾ化の時の pH の調整が不充分なこと，(2) ヂアゾ化した後に酢酸エチルに移した色素の呈色が一定しないこと，(3) 肉抽出液中に *p*-NBD を消耗する成分があつて，*p*-NBD が反応に不足する傾向にあること，(4) 肉抽出液中に *p*-NBD と反応して橙色を生じ，これが Hm のアゾ色素の吸収 550 mμ に影響すること。

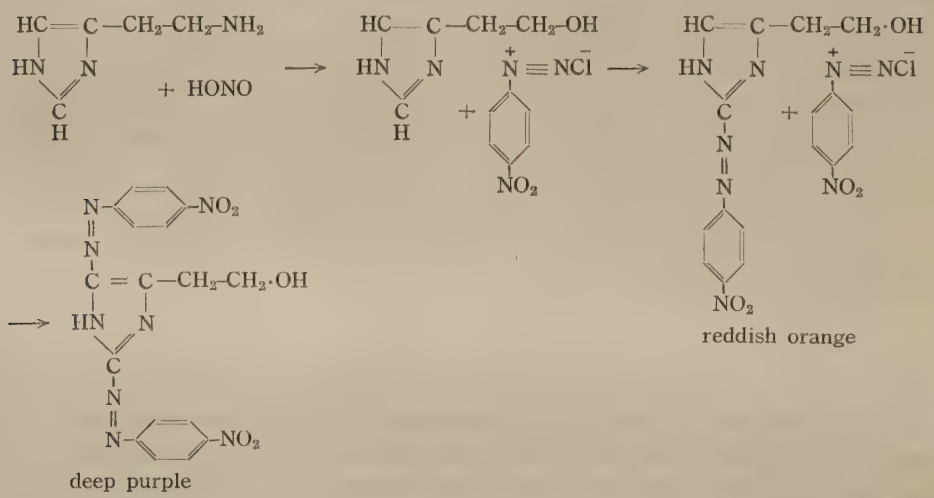
これらの欠点のうち (1) の pH に最適がある理由については，恐らく pH が高すぎると Diazonium ion が Diazohydroxid となつて反応性を失い，逆に pH が低いと Imidazol 核の N に H^+ が入つて反応し難くなるためであろう[7)8)]。この誤差はヂアゾ化の前に抽出液の pH を 9 に調整すれば容易に取除くことができる。(2) の誤差も濃アンモニヤの少量を添加することで解決できる。したがつて定量法の改良の重要点は (3) および (4) である。

(3) の誤差はサバや赤色肉の場合に著明にみられるもので，この種の肉は 1000 mg% 前後の Histidin を含んでおり[9)]，1 mol Histidin は 2 mol *p*-NBD と反応するので[5)6)]，*p*-NBD の消耗は著しい。試薬が消耗すれば Hm: *p*-NBD=1: 2 とならないために，Hm の多い組織では過少となる (Table 3)。*p*-NBD は Hm や Histidin とだけでなく，一般にアミノ酸類と反応する。ZAHN 氏等[10)]の研究によると，Histidin は赤，Tyrosin は赤褐色，Cystin は褐色の色素をつくり，Prolin, Oxyprolin および Cystein はいづれも白色の化合物をつくるが，他の大部分のアミノ酸では黄色の副反応生成物をつくる。すなわち Diazonium ion がアミノ酸を脱アミノ化してオキシ酸にかえ，試薬自身は Diazoaminobenzol の誘導体となり黄色を呈する。このことから考えると *p*-NBD 試薬の場合には 4, 4′-Dinitrodiazoaminobenzol が生成したと推察される。

新鮮なサバ肉抽出液をヂアゾ化した場合の吸収曲線はアミノ酸と *p*-NBD との反応生成物の吸収曲線ときわめて近似している (Figs. 3 および 4)。それゆえに Fig. 3 にみられるように新鮮なサバ肉抽出液をヂアゾ化したものの吸収帯の裾が 530 mμ にかかつて過大値を与えるのは (Table 3)，明かに肉抽出液中のアミ

ノ酸に原因しているに違いない。これが (4) の誤差に外ならない。

かように (3) および (4) の誤差は主としてアミノ酸に原因するものであるから，アミノ酸が *p*–NBD と反応しないように予め変化させるか，あるいは肉抽出液の Hm を混在するアミノ酸から分別して後に *p*–NBD と反応させるか，いずれかの方法を講ずれば，アミノ酸に基く誤差は除去しえられるはずである。まず肉抽出液中のアミノ酸を亜硝酸処理してオキシ酸とし，*p*–NBD と反応しないようにした結果は予想通りに誤差を減少させることに成功した。この処理で Tyrosin は黄色の 0–Nitrosotyrosin となり[11]，ヂアゾ反応は起さない。同様に Tyramin の場合にも亜硝酸処理によつて発色が防がれるものと思われる。他方，Hm の場合にも Imidazol 核がニトロソ化するのではないかと疑われる。しかし CUSMANO・DIDONNA 両氏[12]の研究からみてその可能性は考えられないし，また LIEBERMAN の nitrosamine 反応を試みたところ陰性であつたので，Hm のニトロソ化は否定できる。したがつて亜硝酸処理した Hm と *p*–NBD との反応比からみて，反応生成物はつぎの通りであろう。



上記のような亜硝酸処理を施しても (4) の誤差は完全には除去できない (Table 3)。したがつて微量の Hm の定量には Hm とアミノ酸とを分別せねばならない。本報では肉抽出液を Amberlite IRA–400 (OH 型) に通してアミノ酸を捕集し，Hm を通過させ，つぎに IRC–50 で Hm を捕捉することを試みて成功した。IRC–50 のみで Hm を捕捉し，アミノ酸を通過させることも可能であり，次報で詳細に報告する。かように分離した Hm は亜硝酸処理後に *p*–NBD と反応させると，550 mμ に吸収極大を有するアゾ色素を生成し，純 Hm を同様に処理したものの吸収曲線と完全に一致したので，Hm の完全な定量が実現できた訳である。

太田氏[4]は同氏の方法による回収率が良好なことを報告している。しかし魚肉抽出液およびそれに Hm を添加したものはいずれも同量の阻害物質の発色を含むので，回収率には影響しない。したがつてこの場合には回収率のよいことは定量法の完全さを意味するものではない。

総　　括

Hm の定量値によつて魚肉の鮮度を知る目的で，太田氏の Hm 定量法を試みたところ，二，三の不備な点を認めたので，その原因について研究した。

1. Hm と *p*–NBD との発色反応の最適 pH は 9～9.5 であつた。

2. Hm の定量を阻害する主な物質はアミノ酸である。Hm 量の多い魚肉抽出液の場合には，ヂアゾ化の前に亜硝酸処理を施せば，誤差は除かれる。

3. 酢酸エチルにとけた脱アミノ Hm アゾ色素の呈色度はアンモニヤの添加によつて約 8% 増加し，λ_{max} は 550 mμ に移つた。

4. 定量阻害物質の大部分は魚肉の三塩化酢酸抽出液から，Amberlite IRA-400 (OH 型) に吸着される。Hm はこれに吸着されないが，Amberlite IRC-50 (H 型) に吸着される。

本研究には日本レダリー KK の援助をえた。ここに特記して謝意を表する。

文　　献

1) 富山哲夫・黒木俊一・野村　稔: 本誌, **21**, 958 (1955). 富山哲夫・黒木俊一・前田伝喜・浜田盛治・本田　彰: 本誌, **22**, 120 (1956).
2) R. M. Gesler and M. Matsuba: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **114**, 151 (1955).
3) 門田　元・井上淳太郎: 本誌, **19**, 916 (1953).
4) 太田冬雄: 本誌, **24**, 41 (1959).
5) H. Pauly: *Z. physiol. Chem.*, **42**, 508 (1904).
6) H. Pauly: *ibid.*, **94**, 284 (1915).
7) H. Zollinger: *Helv. Chem. Acta*, **36**, 1723 (1953).
8) C. Wittmar und H. Zollinger: *ibid.*, **37**, 1954 (1954).
9) 日引重幸・清水　亘: 本誌, **24**, 916 (1959).
10) H. Zahn, B. Wollemann, und O. Waschka: *Z. physiol. Chem.*, **294**, 100 (1954).
11) S. L. Philpot and P. A. Small: *Biochem. J.* **32**, 542 (1938).
12) S. Cusmano et G. Didonna: *Gazz. chim. ital.*, **85**, 208 (1955).

食品の鮮度測定法に関する研究—XI.
組織中のヒスタミンの一新定量法

津田 厚・富山哲夫

(1959 年 6 月 15 日受理)

STUDIES ON THE METHOD FOR TESTING THE SPOILAGE OF FOOD—XI.
A NEW METHOD FOR DETERMINATION OF HISTAMINE IN TISSUES

Atsushi Tsuda and Tetuo Tomiyama*

The method herein reported employs Amberlite IRC-50 (H-form) for separating histamine (Hm) from interfering substances in a trichloracetic acid extract of sample tissue. Hm which is adsorbed on the ion exchanger at pH 4.6 is eluted with 0.2N HCl, treated with nitrous acid, and freed from ammonia by vacuum distillation in alkaline reaction. Hm azo pigment which is formed by coupling with *p*-nitrobenzene diazonium chloride at pH 9 can be extracted with ethylacetate, the extract being dehydrated with anhydrous sodium sulfate. Shortly after a small amount of ammonia being added, the absorbance of the azo pigment solution is to be determined at 550 mμ by a Beckman spectrophotometer or an electrophotometer using a filter of 570 mμ.

The recovery of Hm included in several muscle tissue extracts was found 96 to 106%. It was found that the Hm content of mackerel flesh ran parallel with bacterial counts and showed a marked change with quality of the flesh as compared with total volatile bases nitrogen.

太田氏法[1]による肉組織中の Histamine (Hm) の定量は，定量阻害物質の除去なしでは正確な結果を与えないことを津田[2]で明らかにした。定量誤差の最も少ない方法として前報で提案したものは，供試抽出液から Amberlite IRA-400 (OH 型) によつて阻害物質を除去するのに時間がかかる不便をもつていた。

依つて本報では Amberlite IRC-50 を用いる方法を研究した。その結果，ヒスチヂン，チロシン等のアミノ酸を比較的多量含む魚肉中の微量の Hm を定量できる一新法を完成した。本法ではこの新定量法の設定に導いた基礎研究，並びにこの方法を用いて魚肉の腐敗過程をしらべた結果を報告する。

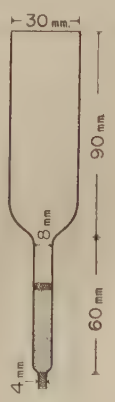


Fig. 1. Column for separation of Hm.

定量方法

1. 器具 (a) Column: Fig. 1 に示す大きさのものを用いた。(b) Amberlite IRC-50 (100 mesh): 30～60 mesh のものを乳鉢で摺りつぶし，60～100 mesh のものを集め，水洗いによつて微細粒子を除いて使用する。(c) 光電比色計あるいは分光光度計。(d) Waring blender.

2. 試薬 (a) Hm 標準液: Hm·2HCl の 100 mg を 0.1N HCl にとかし，100 cc に定容して冷蔵庫に保存する。(b) 酢酸エチル。(c) 1% 炭酸ソーダ。(d) 炭酸ソーダ緩衝液: 4 g の炭酸ソーダと 2 g の重炭酸ソーダとを蒸溜水にとかして 100 cc とし，密栓して保存する。(e) 15% 亜硝酸ソーダ。(f) 5% 臭化カリ。(g) 0.2N 塩酸。(h) 1N 塩酸。(i) 0.1% *p*-nitroaniline: *p*-nitroaniline の 1 g を 1 *l* の 0.1N 塩酸にとかす。(j) 8% 三塩化酢酸。(k) 2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6): 120 g の氷酢酸と 40 g の苛性ソーダを蒸溜水にとかして 1 *l* とする。(l) 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6):

* 九州大学水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ., Fukuoka).

2N 酢酸緩衝液を 10 倍にうすめる。(m) 脱水芒硝。(n) 濃アンモニヤ水。(o) 10% 苛性ソーダ。(p) 0.05% thymol blue 水溶液。

3. 定量操作

1) 試料抽出液の調製: 魚肉 20g を 50cc の蒸溜水とともに blender にかけ, 8% 三塩化酢酸 30cc を加えて沪過する。抽出液 5cc は魚肉 1g に相当する。

2) イオン交換樹脂による Hm の分離: Fig. 1 に示す column の下端を脱脂綿で栓をし, Amberlite IRC-50 (100 mesh) の 2cc を蒸溜水で流し込み, 均一に沈下させる。気泡を完全に除いて樹脂層の上部を平面にならし, 少量の脱脂綿で蓋をする。予め 1N 塩酸 5cc を通し, 約 5cc の蒸溜水で洗つた後, 2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) 5cc を通して樹脂内を pH 4.6 の平衡状態とし, つぎに 5cc の 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) を通す。

Hm の濃度にしたがつて供試液 10～50cc をとり, 10% 苛性ソーダで pH 4.6 に合わせた後, column 内に注入し, 毎分 2～3cc の流速で通す。つぎに樹脂に残つた不純物を 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) の 40cc で完全に駆出する。樹脂に吸着されている Hm は 0.2N 塩酸の 10cc を通して溶出し, 10cc に定容する。

3) 標準曲線: 標準 Hm 溶液を 0.1N 塩酸で稀釈して作つた 0, 1.25, 2.5, 5, 7.5 および 10mcg/cc の Hm 溶液を用いて, 下記の方法で発色し, 標準曲線を画く。

4) 亜硝酸処理: 試料 Hm の溶出液 5cc または標準 Hm 液の 5cc を試験管 (1.5～2.0×20cm) にとり, 0.5cc の 15% 亜硝酸ソーダおよび 0.5cc の 1N 塩酸を混和し, 0.1cc の 5% 臭化カリを促進剤として加えて, 60°C の湯煎中に 5 分間放置する。

5) Hm の発色: 亜硝酸処理後, thymol blue 液 1 滴を加え, 10% 苛性ソーダでアルカリ性とし, 減圧下でアンモニヤを留去し, 塩酸で pH を 9 (緑色) に合わせ, 炭酸ソーダ緩衝液の 1cc と蒸溜水を加えて約 5cc にし, 氷水中に 3～5 分間放置する。他方, 0.1% *p*-nitroaniline 15cc を氷冷し, 0.1cc の 15% 亜硝酸ソーダを加えてヂアゾ化した発色試薬 (*p*-nitrobenzene diazonium chloride) をつくり, その 1cc を前記の冷却した試料に加え, 10 分間 5～10°C の水中に放置する。これに 10cc の酢酸エチルを加えて振盪し, 下層を駒込ピペットで取り除き, つぎに 1% 炭酸ソーダ 5cc を加えて 2 回洗滌を繰返す。

6) 測定: 赤紫色の上層に 2g の脱水芒硝を加え, 測定直前に 2 滴の濃アンモニヤ水を加えて振盪し, 分光光度計を用い, 550mμ の波長で吸光度を測定する。または光電比色計を用い, 530mμ あるいは 570mμ のフィルターをかけて吸光度を測定する。標準曲線より測定値に相当する Hm 濃度を求め, 稀釈倍数を乗じて Hm 含量を算出する。Hm アゾ色素の吸収曲線を Fig. 2 に, 標準曲線の代表例を Fig. 3 に示す。

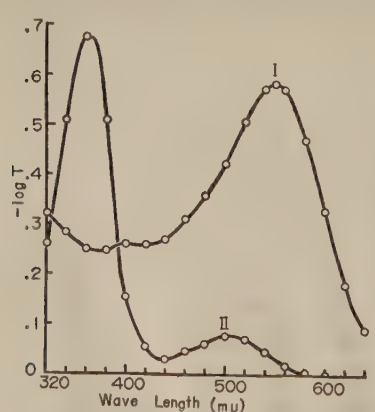


Fig. 2. Absorption spectra of deaminated Hm-azo pigment (I) and of pigment formed on coupling ammonia with *p*-nitrobenzene diazonium chloride (II).

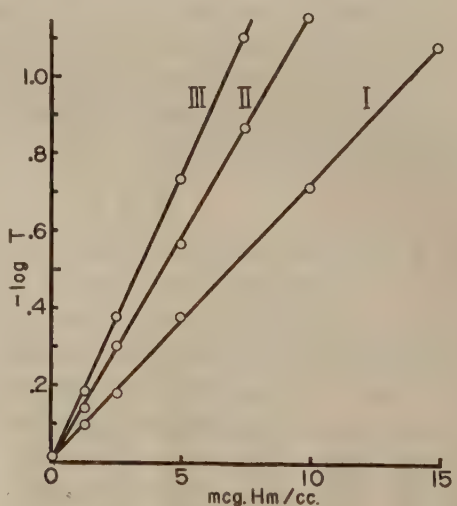


Fig. 3. Standard curves. I: measured by spectrophotometer at 550mμ employing cuvette of 1cm width. II and III: measured by electrophotometer with 570 and 530mμ filter, respectively, 2cm cuvette being employed.

研究結果および考察

1. Amberlite IRC-50 の pH と Hm の吸着度との関係

前報[2]において Amberlite IRC-50 に Hm が吸着されることを明らかにしたが，著者等は IRC-50 を用いて Hm の分離を試みた。まず種々の pH をもつ 2N 酢酸緩衝液を加えて樹脂内の pH を変化させた IRC-50 に対する Hm の吸着行動をしらべた。すなわち，200mcg の Hm を加えた 5cc の魚肉抽出液をそれぞれの緩衝液により pH を調整した IRC-50 の column に通し，吸着した Hm を 0.2N 塩酸で溶出して吸着率を測定した。Table 1 にみられるように，Hm は pH 4.5 で完全に吸着され，0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.5) の 50cc を引続き通しても Hm の流出は全く認められなかつた。他方 pH 4.5 の 0.2N 酢酸緩衝液の 30cc を通すことによつて，Histidin, Tyrosin その他のアミノ酸はすべて完全に溶出されることを濾紙クロマトで確かめた。

Table 1. Adsorption of Hm on Amberlite IRC-50 at varying pH.

	pH of Amberlite IRC-50 adjusted by acetate buffer to pH				
	3.0	3.5	4.5	5.5	7.0
Hm in effluent	84%	4%	0%	2%	35%
Hm adsorbed	16	96	100*	98	65

* No Hm was detected in a washing of the column with 50cc of acetate buffer of pH 4.5.

2. Amberlite IRC-50 の Hm 分離能およびアンモニヤによる定量誤差

IRC-50 の 2cc をつめた column がどれほどの抽出液から Hm を分離する能力があるかを検討した結果は Table 2 に示す通りである。最大限 50cc の抽出液までは 2cc の IRC-50 で Hm を完全に捕捉定量できることが分つた。したがつて魚肉中の Hm は 0.05mg·% までは測定できることになる。鮮度が悪くて Hm を多量に含む抽出液では，交換容量に制限があるために多量の抽出液を通すと回収率が落ちる。また IRC-50 の column に多量の抽出液を繰返し通すと，樹脂内に脂質が沈着するので，イオン交換能と分離能が著るしく低下し，Hm の漏出が起つた。しかし樹脂に沈着した脂質は，再生後アセトンを 20cc 通すと，容易に除くことができた。

抽出液中に Hm が少なくてアンモニヤが多い時には，column 内に蓄積したアンモニヤが 360mμ に大きな，500mμ に小さな吸収極大をもつ橙色に発色するので多少誤差が起る。Fig. 2 にその吸収曲線を，Fig. 4 に 550mμ の吸光度と濃度の関係を示してある。したがつて魚肉中の Hm 含量が 1mg·% 以上でアンモニヤ含量が 20mg·% 以下であればその誤差は無視できるが，Hm が 1mg·% 以下であるときには無視できなくなるので，IRC-50 より溶出した液を亜硝酸処理した後，苛性ソーダでアルカリ性にして減圧下でアンモニヤを留去し，塩酸で pH を 9 に再調整してヂアゾ化す必要がある。

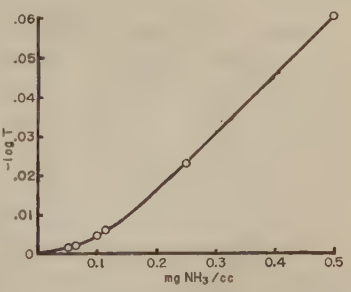


Fig. 4. The change in absorbancy at 550mμ of ammonia azo pigment with varying amounts of ammonia.

なお，ヂアゾ試薬を加えて発色させる時の温度について検討した結果，ヂアゾ試薬は分解を防ぐために氷冷する必要があるが，発色度は 0～20°C の間で温度による差異がほとんどなかつた。ただし低温では反応速度が遅すぎて長時間を要し，高温ではヂアゾ試薬の分解が起つて盲検値が高くなるので，10°C 前後の温度が最も適している。

3. 魚肉および三塩化酢酸抽出液に加えた Hm の回収率

新鮮なサバ肉および腐敗したサバ肉の抽出液の種々の容積に 5～5000 mcg の Hm を添加し，2cc の IRC-50 をつめた column に通し，40cc の 0.2N 酢酸ソーダ緩衝液 (pH 4.6) を通して不純物を洗い去つて後，0.2N HCl の 10cc で Hm を溶出した。Table 3 から分るように，Hm の回収率はかなり広い濃度範囲にわたり，しかも鮮度に関係なく 96～106% であつた。

Table 2. Recovery of Hm from varying volumes of extract.

	Volume of extract (cc) passed through the column					
	5	10	25	50	100	200
	mcg	mcg	mcg	mcg	mcg	mcg
Hm originally present	0	5	12	41	4	820
Hm added	200	200	200	200	50	1000
Hm found	200	204	210	210	48	1210
Recovery	100%	99%	99%	95%	89%	66%

Table 3. Recovery of Hm added to TCA-extract of sample flesh.

		Hm in total volume of sample extract.	Hm added (mcg)	Hm found (mcg)	Recovery (%)
fresh	sample 1	4 mcg/100 cc	5.0	9.3	106
		〃	50	52	96
		〃	200	206	101
	sample 2	0.02 mcg/10 cc	5,000	5,000	100
	sample 3	26 mcg/50 cc	5.0	31	100
		〃	50	74	98
		〃	200	230	102
putrid	sample 1	267 mcg/ 5 cc	200	470	102
	sample 2	925 mcg/10 cc	5,000	5,850	99

Table 4. Recovery of Hm from tissues added with ammonia* (40mg·%) and varying amounts of Hm.

Species of fish	Hm added to tissues mg·%	cc. of extract subjected to chromatography	$-\log T$ at 550mμ	Hm found mcg/cc, eluate	Hm found mg % tissue	Recovery %
Scomber japonicus, Mackerel.	0	10	0.025	0.32	0.13	
	0	20	0.040	0.52	0.13	
	0	50	0.122	1.60	0.16	
	1.0	10	0.202	2.65	1.06	93
	1.0	20	0.305	4.00	1.00	87
	1.0	50	0.795	10.40	1.04	88
	10.0	10	0.375§	4.90	9.80	97
	10.0	20	0.625§	8.14	10.17	100
	10.0	50	0.767†	10.06	10.06	99
Parathunnus obesus, Bigeye tuna.	0	50	0.105	1.40	0.14	
	0.2	50	0.235	3.10	0.31	85
	1.0	20	0.376	4.80	1.20	106
	1.0	50	0.840	11.00	1.10	96
	4.0	20	0.250	3.30	4.13	98
	4.0	50	0.612	8.00	4.00	96

§ and †: the eluates were diluted five times and ten times, respectively.

* The eluates, after being treated with nitrous acid, were freed from ammonia by vacuum distillation in alkaline reaction.

つぎに 40mg·% のアンモニヤと種々の濃度の Hm を加えたサバおよびメバチマグロの肉について，Hm の回収率を測定した。この場合には IRC-50 より溶出した液を亜硝酸処理した後，苛性ソーダでアルカリ性とし減圧蒸溜でアンモニヤを除いてから定量した。Table 4 から明らかなように，アンモニヤによる過大値は認められず，平均 95% の回収率がえられた。

4. 測定波長の選択

亜硝酸処理した Hm の吸収曲線は Fig. 2 に示すように 550mμ に極大があり，一方不純物の発色が 400mμ 以下に極大をもつので，光電比色計でも充分に測定できるに違いない。実際に分光光度計で 550mμ で測定した結果と光電比色計(東京光電)で 530 および 570mμ のフィルターを用いて測定した結果は Table 5 に示すようによく一致した。分光光度計および光電比色計を用いて測定した標準曲線は Fig. 3 に示す通りであるから，570mμ のフィルターを使うと，530mμ のフィルターを使うときより感度は多少落ちるが，不純物による誤差は少ないはずである。Table 5 にみられるように，Hm の低濃度の場合にこの不純物による誤差が認められた。

5. 本法と他の定量法との比較

太田氏の方法，cotton acidsuccinate 法，Amberlite IRA-400 を用いる方法および本法による測定値の比較は Table 6 に示す通りである。太田氏の方法および cotton acidsuccinate 法[3] は Hm を含まぬ新鮮なサバ肉抽出液の場合には本法より高い測定値を示した。また Hm を高濃度に含む抽出液では太田氏法は逆に本法より小さい値を示し，cotton acidsuccinate 法は本法より高い値を示した。この誤差の原因は太田氏法では試薬不足のために過少に，cotton acidsuccinate 法では

Hm 以外で呈色するものが cotton acidsuccinate に吸着されたためであろう。しかし Amberlite IRA-400 により阻害物質を除いてから Hm を定量した値と本法による値とはきわめてよく一致した。したがつて本法はエキス成分の多い赤身の肉の微量 Hm を定量するのに適しているといえる。

Table 5. Comparison of values for Hm in mackerel flesh as determined by spectrophotometer and electrophotometer.

Spectrophotometer (at 550 mμ)	Electrophotometer	
	with 530 mμ filter	with 570 mμ filter
0.2 mg·%	0.5 mg·%	0.2 mg·%
6.4	7.0	6.5
72	70	74

6. 魚肉の腐敗過程と Hm 生成との関係

新鮮な市販のサバ肉をミンチにかけて均一に混和し，ポリエチレンの袋に入れて 5～10°C の冷蔵室に放置し，毎日細菌数，揮発性塩基，Hm の測定および官能検査を行なつた結果は Fig. 5 に示す通りである。揮発性塩基は放置中に徐々に増加するので，初期腐敗の時期が明瞭に判別し難かつたが，ほぼ 4 日目頃とみられる。Hm は 4 日目に増加しはじめ，菌数の増加と傾向が近似しており，腐敗の初期が明らかに判別できた。Hm の生成期は官能検査で認められた異常とも一致した。したがつて肉中の Hm は既往の研究[4,5]から明らかなように細菌によつて生成するものとみられる。腐敗前のサバ肉の Hm 含量として 0.2 mg·% の値がえられたが，この場合にはアンモニヤを駆逐しないでヂアゾ化した時の値で過大な値といえる。恐らく Hm は無菌魚肉の常成分ではないであろう。サバやイワシの場合には Hm の含量と官能検査の結果とがよく一致するので[6,7]，エキス成分の多い魚肉の化学的鮮度判定には Hm 含量が適している。また Hm による鮮度判定は食品衛生の立場からも望ましいことである。

Table 6. Comparison of values for Hm determined by present method and several relevant methods.

Species of fish	Hm (mg·%) The present method	The method with Amberlite IRA-400[2]	Ota's method[1]	Cotton acid succinate method[3]
Scomber japonicus, Mackerel	0.5 64 210	0.6 64 213	45 136 140	28 272
Chrysophrys major, "Tai"	0.2 0.0		12 7.4	2.8
Thunnus alalunga, Albacore	12 84	12	32 140	16

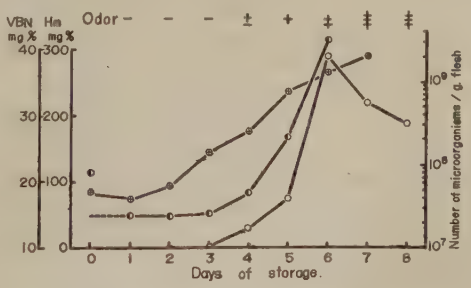


Fig. 5. Formation of Hm during spoilage of mackerel flesh.
Hm: ○—○, Number of microorganisms: ◐—◐, VBN.: ⊕—⊕.

総　　括

魚肉の三塩化酢酸抽出液を pH 4.6 に中和し，pH 4.6 の Amberlite IRC-50 を用いる Ion exchange chromatography にかけて Hm を分離し，*p*-nitrobenzene diazonium chloride で発色させる新定量法を提出した。結果はつぎのように要約できる。

1. Hm は pH 4.6 で Amberlite IRC-50 に定量的に吸着され，0.2N 塩酸で容易に溶出される。
2. Histidin, Tyrosin その他の阻害物質は 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) で column を洗滌することによ

り除去される。IRC-50 の column は多量の組織抽出液を通すと脂質が沈着し，イオン交換能を低下させるので，アセトンで除く必要がある。

3. 回収率は 5～5,000 mcg の範囲で魚肉の鮮度に関係なく 96～106% であつた。

4. 550 mμ で測定できる Hm アゾ色素の感度は 0.5 mcg Hm/cc であり，本定量法の条件では魚肉中の 0.05 mg·% に相当する。

5. 魚肉の腐敗過程における Hm の生成は細菌数の増加および官能検査の異常とよく一致した。

本研究は日本レダリーの援助により行なつた。ここに謝意を表する。

文　　献

1) 太田冬雄: 本誌, **24**, 41 (1959).
2) 津田　厚・森　健児・富山哲夫: 本誌, **25**, 361 (1959).
3) 門田　元・井上淳太郎: 本誌, **19**, 916 (1953).
4) M. KIMATA, M. TANAKA: *Memoirs of Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* **7**, 12 (1954).
5) 河端俊治・石坂公成・三浦利之・佐々木忠尚: 本誌, **22**, 41 (1956).
6) 富山哲夫・黒木俊一・野村　稔: 本誌, **21**, 958 (1955).
7) 富山哲夫・黒木俊一・前田伝喜・浜田盛治・本田　彰: 本誌, **22**, 120 (1956).

魚油から quaternary ammonium 塩の製造並びにその抗菌作用について

豊水正道・榎本則行・富安行雄
(九州大学農学部水産化学教室)

Preparation of Quaternary Ammonium Salts from Fish Oil and their Antibiotic Action

Masamichi Toyomizu, Noriyuki Enomoto and Yukio Tomiyasu

Much attention has been given recently to the biological activity of unsaturated fatty acids. The present paper concerns the antibiotic action of unsaturated quaternary ammonium salts and their preparation method with a view to utilizing fish oil.

The preparation process is as follows:

fish oil or methyl ester of fish oil → alcohol → bromide → triethylammonium bromide / pyridinium bromide

During the above process, the decrease of iodine value is remarkable (ca. 40%), especially in the alcoholization process (ca. 30%) (table 2).

Regarding the antibiotic activity of quaternary ammonium bromides against *Candida albicans*, the activity of triethylammonium bromides is the same as that of corresponding pyridinium bromides. The activity of unsaturated quaternary ammonium bromides is affected by the carbon chain length and the degrees of unsaturation in the long carbon chain, whereas that of saturated compounds is influenced only by the carbon chain length. Any lengthening carbon chain more than C_{16} weakens the activity and an increase of unsaturation enhances it. But it seems that these influencing factors tend to interfere with each other, because there is not any remarkable difference in the antibiotic activity of the six unsaturated quaternary ammonium bromides prepared from methyl esters of calamary oil (table 3).

Triethylammonium bromide prepared from sardine oil inhibits the growth of fungi at 1: 310,000 except *Rhizopus japonicus* and that of yeasts and bacteria at 1: 1600,000 except *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli* (table 4). It is indicated by comparison that the activity of unsaturated quaternary ammonium bromides is superior to that of unsaturated fatty acids or oxidized fatty acids. The facts that the surface of microorganism is, as a rule, negatively charged, and that the unsaturated group of quaternary ammonium bromides in aqueous solution is found in the positively charged portion, may be regarded to have an important role in causing their highly antibiotic activity.

緒　　言

油脂は生体内では energy 源或いは脂溶性 vitamin の運搬媒介物としてのみ役立つものと考えられていたが，最近不飽和脂肪酸は生長，妊娠，皮膚炎及び血液中の cholesterol 含量等に関係していることが明らかにされたので不飽和脂肪酸の生物に対する作用の研究が注目されるようになつた。

不飽和脂肪酸は微生物に対して増殖促進と抑制作用との相反する二つの作用を示すが，一般に分子中の二重結合数が増加すると共に促進作用は減少し[1,2]，抑制作用は増大するといわれている[3,4]。Solamides[5]，Hanel 等[6]は鱈肝油及びその高度不飽和脂肪酸の細菌増殖抑制作用について報告しているが，不飽和脂肪酸

1958 年 8 月 18 日受理

の抑制作用は GRAM 陽性菌に対してのみ有効である[7,8]。脂肪酸の抑制作用については不飽和脂肪酸のみならず飽和脂肪酸にも有効なものが存在することは古くから知られており，NIEMAN[9] は不飽和脂肪酸の抑制作用は分子中の二重結合数の増加と共に増大し，飽和脂肪酸の抑制作用は分子中の炭素数と関係があり C_6～C_{12} の脂肪酸が強いと述べている。他方 MCKEE 等[10] は脂肪酸の抗菌作用には不飽和度よりも炭素数がより重要な因子であると主張した。

酸化油が生物に対し阻害的に作用することは既に知られている。WILBUR 等[11] は酸化 methyl linolenate が細胞分裂を抑制すると述べ，OTTOLENGHI 等[12] 及び BERNHEIM 等[13] は酸化 methyl linoleate 及び酸化 methyl linolenate が二十日鼠の mitochondria の酸化酵素を阻害すると述べている。また CLAUDE[14] 及び MOLONEY[15] は癌細胞から抽出された酸化油状物質が Rous virus の発育を抑制すると報告している。最近 TAPPEL[16] は酸化不飽和脂肪酸が aldehyde-amino 縮合反応によつて蛋白質と結合すると述べているが，NARAYAN 等[17] は水素結合により蛋白質と酸化 linoleate とが結合すると主張している。酸化不飽和脂肪酸と蛋白質とが結合するという事実はその機構が如何ようであろうとも，酸化油の抗菌作用が菌体との化学的結合に基くことを暗示している。

著者等は魚油の高度不飽和性に着目してその利用研究のために酸化魚油の抗菌作用について研究し，不飽和脂肪酸の作用は酸化によつて強化されることを明らかにした[18]。然しこれ等不飽和脂肪酸及び酸化不飽和脂肪酸の抗菌作用は強力なものではなく，しかも水に不溶性であるという欠点がある。これ等の欠点を改良するために魚油から界面活性剤を製造し，その抗菌作用と分子中の不飽和度との関係について研究を行つた。

魚油の主成分は不飽和脂肪酸の glyceride であるが，その不飽和脂肪酸を構成している長炭素鎖（疎水基）に親水基を結合させることによつて水溶性の界面活性剤が得られる。界面活性剤の抗菌作用については non-ion 活性剤は微生物の代謝には殆んど影響を与えないが[19,20]，cation 活性剤及び anion 活性剤は共に阻害作用を有し，前者は後者よりも強力である[21]。BAKER 等[22] 及び ORDAL 等[23] は cation 活性剤は GRAM 陽性菌にも陰性菌にも有効であるが，anion 活性剤には選択性があると報告している。本研究に先だち著者等はイカ肝油脂肪酸及びその methyl ester を chlorosulfonic acid で sulfon 化して anion 活性剤を調製しその抗菌作用を試験したところ満足すべき結果は得られなかつたので cation 活性剤を調製することにした。cation 活性剤の中でも quaternary ammonium 塩は強力な抗菌作用を有し，VALKO 等[24] は *Staphylococcus aureus* を 1: 10,000 で *Eberthella typhosa* を 1: 19,000 で抑制すると述べ，また HEINEMAN[25]，DUNN[26]，HOWARD 等[27] 及び LAWRENCE[28] は細菌のみならず糸状菌にも有効であると報告している。

飽和 quaternary ammonium 塩の化学構造と抗菌作用との関係については系統的な研究が行われ，長炭素鎖中の炭素の数が最も重要な因子であることが指摘されている。VALKO 等[24]，SHELTON 等[29] 及び HOOGERHEIDE[30] は $RN^+(CH_3)_3$ 型の quaternary ammonium 塩（trimethylammonium 塩）について長炭素鎖（R）の炭素数と抗菌作用との関係を C_6～C_{18} のものについて検討し C_{16} が最も有効であると述べている。他方 dimethylammonium chloride では C_{14} が最も有効であるといわれている[24]。不飽和度と抗菌作用との関係については 9-octadecenyl 基についてのみ研究が行われ二重結合が二つ以上存在するものについては研究されていない。即ち 9-octadecenyldimethylbenzylammonium chloride は octadecyldimethylbenzylammonium chloride よりも有効であり[24]，9-octadecenyltrimethylammonium bromide は octadecyltrimethylammonium bromide よりも有効であると報告されている[29]。これ等の結果から不飽和基の導入には何れの型の quaternary ammonium 塩が抗菌作用の増強に適当であるかは結論し得ないが，不飽和基を置換することにより抗菌作用の増強を期待し得る。上述諸氏の研究結果から考察すると魚油から quaternary ammonium 塩を製造するに当つては長炭素鎖中の炭素数と不飽和度との二つが重要な因子であると考えられる。魚油の脂肪酸を構成している炭素鎖の炭素数は植物油のそれよりも多くて 15～21 であるから炭素数の多い炭素鎖によつて強い抗菌作用をもつ quaternary ammonium 塩を製造することが必要である。著者等は C_{16} の炭素鎖で最強の作用をもつ trimethylammonium 塩を製造する方が C_{14} の炭素鎖で最強の作用をもつ dimethylbenzylammonium 塩を製造するよりも有効的であると考えた。然るに trimethylam-

monium 塩では methyl 基を ethyl 基で置換しても抗菌作用には影響がないといわれ[29]，また KOLLOFF 等[31] 及び SHELTON 等[29] は alkyl pyridinium bromide も C_{16} の炭素鎖で抗菌作用が最大であると述べているので本研究では triethylammonium bromide と pyridinium bromide とを魚油から製造し抗菌作用について研究を行つた。

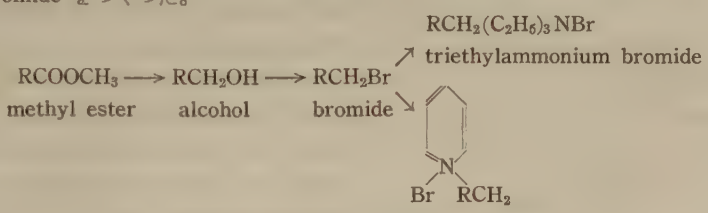
実験及び考察

I. 魚油から quaternary ammonium 塩の製造

イカ肝油を鹸化・methyl 化した後減圧蒸溜して3区分に分留した。各区を脱酸後再び減圧蒸溜して3区分の脂肪酸 methyl ester を得た（第1表）。この各区分を試料とし次の過程を経て triethylammonium bromide 及び pyridinium bromide をつくつた。

Table 1. Fractionation of methyl esters derived from calamary oil.

No. of fraction	boiling range °C/mm	saponification value	iodine value
F-1	145～169/1.5	204.2	71.8
F-2	158～188/2.2	187.0	167.7
F-3	175～196/1.5	173.3	266.1



ethylene glycol monoethyl ether を還元用 alcohol として金属ナトリウムで脂肪酸 methyl ester を常圧還元して alcohol を得[32]，次に phosphorus tribromide を用いて 80°C で2時間反応させて alcohol を臭素化して bromide を得た。bromide から quaternary ammonium bromide の調製は次の方法によつた。即ち ethyl alcohol 中で triethylamine と 95°C，3時間反応させて triethylammonium bromide を得[30]，pyridinium bromide は pyridine と 150°C，1.5 時間反応させて得た[33]。

この過程中における二重結合の変化を追求するために沃素価を測定した。最終生産物である triethylammonium bromide 及び pyridinium bromide は WIJS 法によつては終点が不明瞭のために測定出来なかつたので methyl ester から bromide (RCH_2Br) までの沃素価の変化のみを第2表に示した。沃素価の減少率は約 40% でそのうち methyl ester → alcohol の還元反応中における減少率は約 30% で特に著しかつ

Table 2. Changes in iodine value during the preparation procedure of quaternary ammonium bromides from methyl esters derived from calamary oil.

	F-1			F-2			F-3		
	methyl ester	→ alcohol	→ bromide	methyl ester	→ alcohol	→ bromide	methyl ester	→ alcohol	→ bromide
Boiling range (°C/mm)	145～169/1.5	129～142/1.5	145～181/2.0	158～188/2.2	168～178/2.5	164～180/1.0	175～196/1.5	190～217/2.5	194～209/2.0
Molecular weight[1]	274.7	246.7	309.6	300.0	272.0	334.9	323.7	295.7	358.6
Iodine value (A)	71.8	57.0	40.1	167.7	130.6	93.0	266.1	201.4	147.2
Theoretical iodine value (B)[2]	71.8	79.9	63.7	167.7	185.0	150.2	266.1	291.3	240.2
$\frac{A}{B} \times 100$	100	71.3	63.0	100	70.6	61.9	100	69.1	61.3
Decrease of double bond (%)	28.7		8.3	29.4		8.7	30.9		7.8

1) calculated from saponification value in table 1 and structural formula.
2) calculated from iodine value of methyl ester and molecular weight.

た。bromide (RCH_2Br) の二重結合は各区分の溜出温度の上昇に伴ない増加し，沃素価はそれぞれ 40.1，93.0，147.2 であつた。

II. quaternary ammonium bromide の抗菌作用に及ぼす長炭素鎖中の炭素数及び不飽和度の影響

2倍稀釈法により所要濃度の quaternary ammonium bromide を含有する 5 cc の SABOURAUD の peptonedextrose 培地 (pH 6.1) を調製し，48 時間培養した *Candida albicans* の液体培養を上記培地に1滴宛接種して 30°C, 48 時間後菌の増殖状態を濁度によつて判定した。

イカ肝油から得た不飽和 quaternary ammonium bromide の抗菌作用を飽和化合物と比較検討するために tetradecyltriethylammonium bromide, tetradecylpyridinium bromide, hexadecyltriethylammonium bromide, hexadecylpyridinium bromide, octadecyltriethylammonium bromide 及び octadecylpyridinium bromide を前述の方法によつてそれぞれ bromotetradecane, bromohexadecane 及び bromooctadecane から合成した。

Table 3. Inhibitory activity of saturated and unsaturated quaternary ammonium bromides on *Candida albicans*.

	32	16	8 γ/5cc.
TRIETHYLAMMONIUM BROMIDE			
Tetradecyl	−	＋	＋＋
Hexadecyl	−	−	±
Octadecyl	−	−	＋
F-1	−	−	＋＋
F-2	−	−	＋
F-3	−	−	＋
PYRIDINIUM BROMIDE			
Tetradecyl	−	＋	＋＋
Hexadecyl	−	−	±
Octadecyl	−	−	＋
F-1	−	−	＋＋
F-2	−	−	＋
F-3	−	−	＋

−; No growth　　±; Doubtful growth
＋;Slight growth　　＋＋; Normal growth

イカ肝油脂肪酸 methyl ester から得た6種の不飽和 quaternary ammonium bromide 及び炭素数を異にする上述6種の飽和化合物についての抗菌作用を第3表に示した。先ず triethylammonium bromide と pyridinium bromide との抗菌作用についてみると飽和化合物でも不飽和化合物でも長炭素鎖中の炭素数と不飽和度が同一である場合には抗菌作用は同じであつた。次に6種の飽和化合物について炭素数と抗菌作用との関係を検討してみると hexadecyltriethylammonium bromide 及び hexadecylpyridinium bromide が C_{14}, C_{18} の化合物よりも作用が強く，長炭素鎖中の炭素数を 16 より多くすることもまた少くすることも抗菌作用を弱くする傾向にあることが分る。この結果は SHELTON 等[29] 及び KOLLOFF 等[31] の報告と一致している。イカ肝油脂肪酸 methyl ester から得た6種の不飽和 quaternary ammonium bromide の抗菌作用には顕著な差異は認められなかつた。然し詳細に検討すると F-2, F-3 から得たものは triethylammonium bromide でも pyridinium bromide でも飽和 C_{18} 化合物とその作用は同一であり，F-1 から得たものよりも僅かではあるが強力である。第1表に示した鹸化価から methyl ester の $COOCH_3$ 基に結合している炭素鎖の平均炭素数を求めると F-1, F-2, F-3 でそれぞれ 15, 17, 19 であるが，alcohol 化反応でこの炭素鎖の炭素数は1ケ宛増加するから quaternary ammonium bromide の長炭素鎖の平均炭素数はそれぞれ 16, 18, 20 となる。炭素数だけを考えると F-1 から得た quaternary ammonium bromide の抗菌作用は最強であるべきにも拘わらず実際には最も弱い。これ等の化合物は不飽和であるからその抗菌作用を論ずるには不飽和度による抗菌作用の増強をも考慮に入れなければならない。第2表の bromide (RCH_2Br) の沃素価から推定すると quaternary ammonium bromide の長炭素鎖中の不飽和度は F-3 > F-2 > F-1 となる。F-1 から得た quaternary ammonium bromide は長炭素鎖中の炭素数からは最強の抗菌作用を示すべきであるが不飽和度からは最弱の抗菌作用を示すものと考えられる。他方 F-3 から得た quaternary ammonium bromide では高度の不飽和による抗菌作用の強化と炭素数が 16 よりも多いための弱化という二つの因子が存在することになる。この相反する二つの因子が互いに干渉し合つた結果各区分の抗菌作用には顕著な差異が認められなかつたが F-3, F-2 > F-1 の順となつたものと考えるのが妥当であろう。

III. 不飽和 triethylammonium bromide の抗菌 spectrum

不飽和 quaternary ammonium 塩の細菌類及び真菌類に対する抗菌作用を明らかにするために鰮油（沃素価 147.8，鹸化価 190.1，酸価 0.2）から前述の方法によつて蒸溜温度 180°～195°C/4.5mm の bromide（沃素価 65.6）を得，これから triethylammonium bromide をつくつた。

細菌類には bouillon 培地（pH 7.0）を，真菌類には含糖 peptone 酵母エキス培地（pH 6.6）を用いて 5cc の培地に所要量の不飽和 triethylammonium bromide を添加，菌を接種して 30°C，48 時間後菌の増殖状態を濁度によつて判定した。その結果は第 4 表の如くである。GERSHENFELD 等[34] 及び HOOGERHEIDE[30] が指摘している如く quaternary ammonium 塩の抗菌作用は培地の pH によつて影響され，一般に pH が高い方が強くなるので pH の異る培地での細菌類と真菌類に対する作用を同一視して比較することは妥当でないかも知れない。黴類に対する作用は細菌類・酵母類に対してよりも弱いが 16γ（約 31 万倍）で *Rhizopus japonicus* 以外の黴類の増殖を完全に抑制した。腐敗細菌である *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris* 及び *Escherichia coli* には 32γ 添加しても無効であつたが，その他の細菌類及び酵母類に対しては抗菌作用が極めて強く 3.2γ（約 160 万倍）で増殖を全く抑制した。

Table 4. Antibiotic spectrum of triethylammonium bromide prepared from sardine oil.

Bacteria (γ/5cc.)	32	16	3.2	Eumycetes (γ/5cc.)	32	16	3.2
Pseudomonas fluorescens	++	++	++	*Saccharomyces sake*	−	−	−
Vibrio liquefaciens	−	−	−	〃 *cerevisiae*	−	−	−
〃 *aquatilis*	−	−	−	Distillery yeast Race II	−	−	−
Micrococcus varians	−	−	−	〃 〃 〃 XII	−	−	−
〃 *perflavus*	−	−	−	*Debaryomyces japonicus*	−	−	−
〃 *subflavus*	−	−	−	〃 *membranaefaciens*	−	−	−
〃 *subcitreus*	−	−	−	*Hansenula javanica*	−	−	++
〃 *conglomeratus*	−	−	−	*Schizosaccharomyces pombe*	−	−	−
〃 *freudenreichii*	−	−	−	*Torulopsis utilis*	−	−	−
〃 *epidermidis*	−	−	−	*Endomyces albicans*	−	−	++
Streptococcus liquefaciens	−	−	−	*Oospora lactis*	−	−	±
Escherichia coli	++	++	++	*Rhizopus japonicus*	+	++	++
Proteus vulgaris	++	++	++	*Aspergillus candidus*	−	−	++
Flavobacterium marinum	−	−	−	〃 *glaucus*	−	−	−
Bacillus subtilis	−	−	−	〃 *melleus*	−	−	++
〃 *mesentericus*	−	−	−	〃 *niger*	−	−	+
〃 *cereus*	−	−	−	〃 *oryzae*	−	−	++
〃 *repens*	−	−	−	〃 *repens*	−	−	±
				Penicillium chrysogenum	−	−	++
				〃 *granulatum*	−	−	±

魚油から得た不飽和 quaternary ammonium bromide の抗菌作用は著者等が先に発表した魚油・不飽和脂肪酸及び酸化不飽和脂肪酸の抗菌作用[14]と比較して極めて強力である。その理由としては水に対する溶解性の相違も問題となろうが，一般に菌体は − に負荷されており quaternary ammonium bromide では二重結合が水溶液中で + に負荷されている部分に存在しているということが大きな原因と考えられる。

要　　約

1. 魚油利用の見地から不飽和 quaternary ammonium 塩の抗菌作用並びにその製法について研究した。

2. その製造過程は次の如くである。

魚油または魚油脂肪酸 methyl ester ⟶ alcohol ⟶ bromide ⟶ triethylammonium bromide / pyridinium bromide

3. 上記過程中における沃素価の減少は顕著であり (約 40%), その大部分の減少は methyl ester→alcohol の還元反応中にあらわれその減少率は約 30% で特に著しい。

4. quaternary ammonium bromide の *Candida albicans* に対する抗菌作用は長炭素鎖の構造が同一であれば triethylammonium bromide でも pyridinium bromide でも同じである。

5. 飽和 quaternary ammonium bromide の抗菌作用には長炭素鎖中の炭素数だけが関係するが，不飽和化合物では炭素数と不飽和度とが関係する。炭素数を 16 よりも多くすることは作用を弱くし，不飽和度の増加は作用を強くする。然し乍らイカ肝油脂肪酸 methyl ester から得た 6 種の不飽和 quaternary ammonium bromide の抗菌作用には著しい差異がみられなかつたのでこの二つの因子は互いに打消し合つたものと考えられる。

6. 鰮油から得た不飽和 triethylammonium bromide は *Rhizopus japonicus* 以外の黴類を 31 万倍で，また *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* 以外の細菌類及び酵母類を 160 万倍で抑制し，抗菌作用は極めて強力であつた。

文　　献

1) Pollock, M. R.: Symposia Soc. Exptl. Biol., **3**, 193, 1949.
2) Axelrod, A. E., Mitz, M. A. & Hofmann, K. J.: J. Biol. Chem., **175**, 265, 1948.
3) Laser, H.: Biochem. J., **51**, 57, 1952.
4) Wyss, O., Ludwig, B. J. & Joiner, R. R.: Arch. Biochem., **7**, 415, 1945.
5) Solamides, J.: Compt. rent. Soc. Biol., **140**, 111, 1946.
6) Hanel, F. & Piller, S.: Beitr. Klin. Tuberk., **103**, 239, 1950.
7) Kodicek, E.: Symposia Soc. Exptl. Biol., **3**, 217, 1949.
8) Dubos, R. J.: J. Exptl. Med., **85**, 9, 1947.
9) Nieman, C.: Bact. Reviews, **18**, 147, 1954.
10) Mckee, C. M., Dutcher, J. D., Groupe, V. & Moore, M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **65**, 326, 1941.
11) Wilbur, K. M., Kenaston, C. B., Wolfoson, N., Ottolenghi, A. & Gaulden, N. E.: Anat. Rec., **120**, 708, 1954.
12) Ottolenghi, A., Bernheim, F. & Wilbur, K. M.: Arch. Biochem. Biophys., **56**, 157, 1955.
13) Bernheim, F., Wilbur, K. M. & Kenaston, C. B.: Arch, Biochem., **38**, 177, 1952.
14) Claude, A.: Science, **90**, 213, 1939.
15) Moloney, J. B.: J. Nat. Cancer Inst., **18**, 515, 1957.
16) Tappel, A. L.: Arch. Biochem. Biophys., **54**, 266, 1955.
17) Narayan, K. A. & Kummerow, F. A.: J. Am. Oil Chem. Soc., **35**, 52, 1956.
18) 富安行雄・豊水正道・高橋喜久雄: 本誌, **18**, 530, 1953.
19) Baker, Z., Harrison, R. W. & Miller, B. F.: J. Exptl. Med., **74**, 621, 1941.
20) Hotchkiss, R. D., Ann, N. Y.: Acad. Sci., **46**, 479, 1946.
21) Baker, Z., Harrison, R. W. & Miller, B. F.: J. Exptl. Med., **73**, 249, 1941.
22) Baker, Z., Harrison, R. W. & Miller, B. F.: J. Exptl. Med., **74**, 611, 1941.
23) Ordal, E. J, & Borg, A. F.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **50**, 332, 1942.
24) Valko, E. I. & Du Bois, A. S.: J. Bact., **50**, 481, 1945.
25) Hfineman, P. G.: J. Am. Pharm. Assoc., **26**, 711, 1937.
26) Dunn, C. G.: Am. J. Hyg., **26**, 46, 1937.
27) Howard, F. L. & Keil, H. L.: Phytopathology. **33**, 1116, 1943.
28) Lawrence, C. A.: J. Bact., **53**, 375, 1947.
29) Shelton, R. S., Van Campen, M. G., Tilford, C. H., Lang, H. C., Nisonger, L., Bandelin, F. J. & Robenkoenig, H. L.: J. Am. Chem. Soc., **68**, 753, 1946.
30) Hoogerheide, J. C.: J. Bact., **49**, 277, 1945.
31) Kolloff, H. G., Wyss, A. P., Himelick, R. E. & Mantele, F.: J. Am. Pharm. Assoc., **31**, 51, 1942.
32) 益山新六: 農化, **26**, 524, 1952.
33) Knight, G. A. & Shaw, B. D.: J. Chem. Soc., 682, 1938.
34) Gershenfeld, L. & Milanick, V. E.: Am. J. Pharm., **113**, 306, 1941.

M. KITAMIKADO

Alteration of yeast cell protein by denaturing agents

Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture,
Kyūshū University, Vol. 11, No. 2, August 31, 1959

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 11, No. 2
August 31, 1959

Alteration of yeast cell protein by denaturing agents

Manabu Kitamikado

In microbiology the treatments for inhibition of microbial growth have been carried out by using the denaturing agents such as acids, bases, organic solvents, salts of heavy metals, detergents, and other compounds as well as by heating, irradiation with ultraviolet rays or ultrasonic waves, and other physical means. It is commonly considered that the denaturing agents bring about the alteration of the microbial cell proteins and disturb the growth. By means of the determination of phosphorus or nitrogen flowing out of the cells, Hotchkiss[1] has demonstrated that certain detergents disrupted the surface structures of bacterial cells.

The author studied the effects of cations on the penetration of Na ion into the yeast cells and found that the cells took a larger amount of Na ion when certain heavy metal ions were present than when Ba, Ca, or Mg ion was present or when no other ions were

Table 1. Amounts of Na ion taken in yeast cell in the presence of various cations.

Metallic salt	Conc. of metallic salt	Na ion in cell*
$BaCl_2$	1×10^{-1}M	2.0 mg.
$CaCl_2$	1×10^{-1}	2.0
$MgCl_2$	1×10^{-1}	2.0
$CuCl_2$	6×10^{-2}	3.0
$HgCl_2$	2×10^{-3}	3.6
$AgNO_3$	2×10^{-3}	3.5
Control	0	2.0

* Amount of Na ion in cell is expressed as mg. of NaCl/100 mg. of yeast cell.

(Table 1). It was considered that this phenomenon resulted from the alteration of the yeast cells by heavy metals which act as denaturing agents of proteins. Therefore the changes of the amount of Na ion taken in cells, brought about not only by heavy metals but also by some other kinds of denaturing agents, were studied.

In microbiology it is a well-known process to distinguish living cells from dead cells by using certain dyes. After denaturation some proteins change their original capacity to combine with certain dyes.[2~5] Oster[6] has reported that fluoresceins (eosine, erythrosine and Bengal rose) hardly combined with intact tobacco mosaic virus or egg white, but that they combined with heated proteins and moreover modified their absorption spectra by the combination.

In this paper, therefore, the relationship between the adsorption of eosine yellowish by yeast cells and the denaturation of the cell proteins was also studied. In addition to the above experiments, the change of the activity of SH groups contained in yeast cells was studied, because the denaturation of protein is frequently accompanied by the increase of the activity of the groups.

Experimental method

1) *Amount of Na ion taken in yeast cell*

After centrifuging the cultures of *Saccharomyces sake* (Peptone-Hayduck medium,* 30°C., 40 hrs.), the cells were washed with distilled water 3 times and suspended in distilled water. Five ml. of cell suspension (including about 100 mg. wet cells), after the denaturing agent being added to it, was left for 5 min. at room temperature (15~16°C.). After centrifuging, the cells were washed with distilled water 2 times, and suspended again in 10 ml. of distilled water. Then 10 ml. of 2 M NaCl solution was added to the suspension, and the latter was left for 10 min. The suspension was filtered with No. 4 glass filter by using a strong sucker. The external moisture was removed from the yeast cells during the process of the filtration (the layer of the cells on the glass filter was less than 1 mm. thick). Fifty mg. of the treated cells was suspended in 20 ml. of distilled water, the Na ion content in this suspension was estimated by means of flame photometry at 589 mμ, and the amount of Na ion taken by yeast cells was calculated. In this case the cellular components scarcely interfere with this flame photometry (Table 2). The effect of heating was studied with the cell suspension which was heated in water bath at test temperature for 5 min., then cooled quickly down to room temperature.

* Peptone, 1%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3%; KH_2PO_4, 0.1%; Glucose, 5%

Table 2. Effect of yeast cell components on the flame photometry of Na ion.

No.	Component of sample	Conc. of Na ion
1	10 ml. of 3.4×10^{-3}M NaCl+50 mg. washed cell	101.8%
2	〃 +50 mg. cell heated to 90°C.	97.5
3	〃 +50 mg. cell exposed to M/10 KH_2PO_4*	102.0
4	〃 +50 mg. cell exposed to 2 M H_2SO_4*	102.2
5	〃 +50 mg. cell exposed to 3×10^{-2}M $CaCl_2$*	103.3
6	〃 +50 mg. cell exposed to 2×10^{-3}M $HgCl_2$	102.0
7	〃 +50 mg. cell exposed to 50% Ethanol	104.5
8	10 ml. of 3.4×10^{-3}M NaCl (Control)	100.0

* It has been reported that a large amount of P, Ca or strong acid interferes with the Na determination by flame photometric method.

Wallace, W. M., Holliday, M., Cushman, M. and Elkinton, J. R., 1951. J. Lab. and Clin. Med., **37**, 621.

Parks, T. D., Johnson, H. O. and Lykken, L., 1948. Anal. Chem., **20**, 822.

When the yeast cells were suspended in 1 M NaCl solution, the amount of Na ion taken in cells was 2 mg. expressed as NaCl per 100 mg. of the cells, and the percentage of the moisture of the cells was 46, therefore the concentration of the Na ion in cell was about 75 per cent of that of the external environment.

2) Adsorption of eosine by cells

The denaturing agent was added to 5 ml. of washed cell suspension, and the suspension was left for 10 min. The cells were centrifuged, washed with M/50 phosphate buffer solution (pH 5.4) 2 times, and suspended in 10 ml. of the same phosphate buffer solution. Ten ml. of 2×10^{-5}M eosine yellowish solution was added to this suspension, and the optical density of the centrifuged supernatant of the suspension was determined at 514 mμ after 20 min.

3) Activity of SH groups

After the addition of the denaturing agent, 10 ml. of the cell suspension (dry weight 63.6 mg.) was left for 10 min., then the cells were washed with distilled water 2 times and suspended in 18 ml. of distilled water. One ml. of 8 M ammoniac solution and 1 ml. of 2 M NH_4No_3 solution were added to this suspension, and the SH groups contained in the cells were determined by means of amperometric titration with 10^{-3} M $AgNO_3$ solution.

4) Fungicidal action of denaturing agents

Yeast cells (dry weight 10 mg.) were suspended in 5 ml. of distilled water containing various amounts of denaturing agents, and left for 10 min., then 2 drops of the suspension were inoculated to 5 ml. of fresh Peptone-Hayduck medium, and the turbidity of the medium was inspected after 2 days at 30°C. In the case of acid or alkaline treatment, the cell suspensions were neutralized with dilute NaOH or H_2SO_4 solution and then 2 drops of the suspension were inoculated. In the heating test, the cell suspension was heated in water bath at test temperature for 5 min., and cooled quickly down to room temperature and then 2 drops were inoculated. The fungicidal activity of $HgCl_2$ was also determined after one of the following treatments being carried out.

(1) Cysteine-HCl (0～50 mg. in weight) was added to the cell suspension exposed to $HgCl_2$ and then 2 drops of the suspension were inoculated to 5 ml. of fresh medium.

(2) The cells exposed to $HgCl_2$ were washed 3 times with water and the cells were suspended in 5 ml. of distilled water and then 2 drops were inoculated.

(3) Two drops of the cell suspension exposed to $HgCl_2$ were inoculated to 5 ml. of fresh medium containing 0～5 mg. of cysteine-HCl. The results showed that hardly any difference could be found in the fungicidal activity of $HgCl_2$, whether treated with cysteine or with water or without either.

Results and discussion

In these experiments the change of the amount of Na ion taken in cell has been applied to the indication of the denaturation of yeast cell proteins, which was formerly done by the increase of SH groups or the change of adsorption of eosine. The denaturation by $HgCl_2$ or formaldehyde was indicated by the change of the amount of Na ion in cell and of the adsorption of the dye, because the chemicals react to the SH groups contained in the undenatured and denatured yeast cell proteins. The mechanism by which the amount of Na ion taken in yeast cell is changed remarkably when the cells are exposed to certain chemical or physical treatments is not yet certainly known.

As a result of the comparison between the concentration of denaturing agent to show the fungicidal action and the concentration at which the denaturation of yeast cell proteins was brought about, it was found that the chemicals fell in 2 types. One typical agent was alcohol, the action of which on the yeast cells was similar to that of heating. Alcohol, even below the fungicidal concentration, brought about the denaturation of cell proteins, and the concentration of alcohol

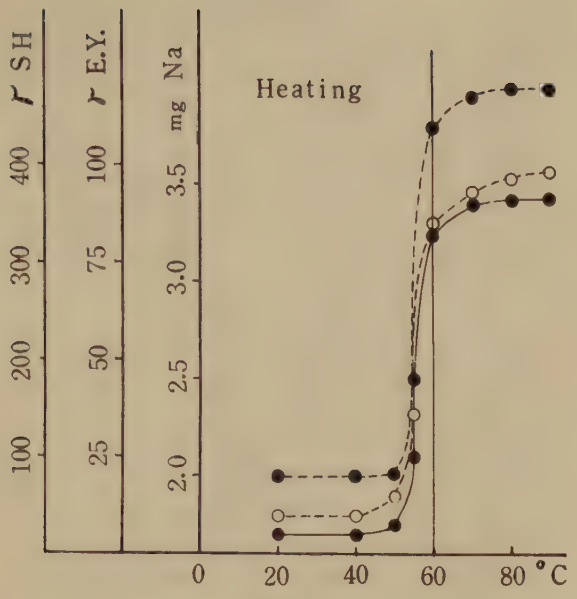


Fig. 1

Figs. 1~8. Effects of denaturing agents and heating on the amount of Na ion in yeast cell, adsorption of eosine by cell and activity of SH groups of cell protein.

●——● SH group (expressed as γ of cysteine) liberated from dry weight 63.6 mg. of yeast cells.

○----○ Eosine Yellowish adsorbed by yeast cell

Dry weight of yeast cell used for

Heating	54.3 mg.	Mercuric chloride	54.3 mg.
Ethanol	„	Formaldehyde	„
Acetone	„	Sulfuric acid	1.8
Phenol	„	Potassium hydroxide	„

●----● Na ion (expressed as mg. of NaCl/100 mg. of yeast cells) taken in yeast cell

The longitudinal line in each figure (Heating, 60°C.; Ethanol, 35%; Acetone, 35%; Phenol, 0.2 M; Sulfuric acid, 0.9 M; Potassium hydroxide, 0.26 M; Mercuric chloride, 0.001 M; Formaldehyde 0.5 M) shows the minimum temperature or concentration to show the fungicidal action.

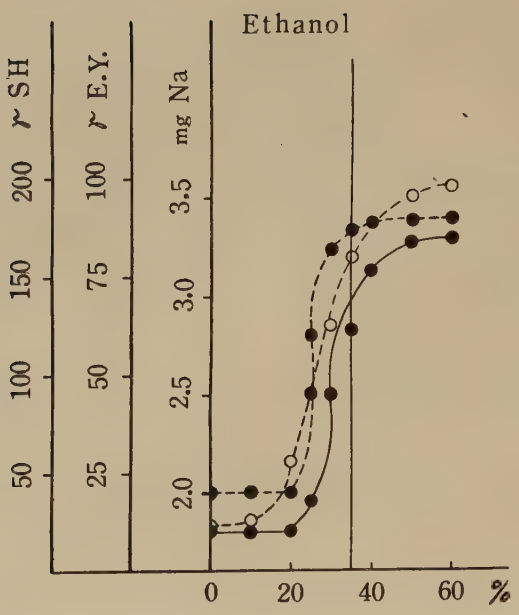

Ethanol
γ SH
γ E.Y.
mg Na
50
100
150
200
25
50
75
100
2.0
2.5
3.0
3.5
0
20
40
60
%

Fig. 2

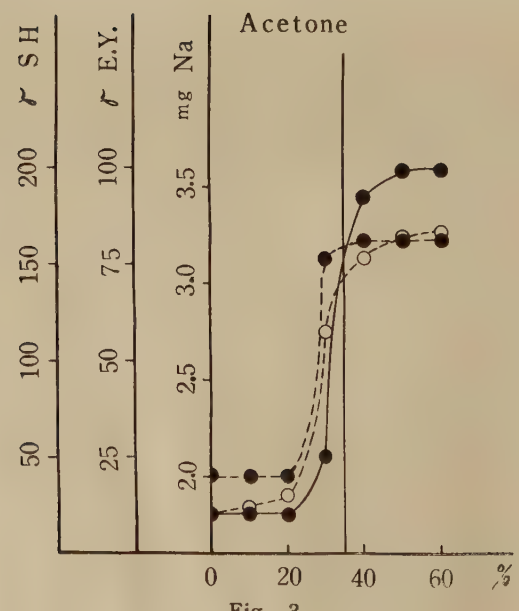

Acetone
γ S H
γ E.Y.
mg Na
50
100
150
200
25
50
75
100
2.0
2.5
3.0
3.5
0
20
40
60
%

Fig. 3

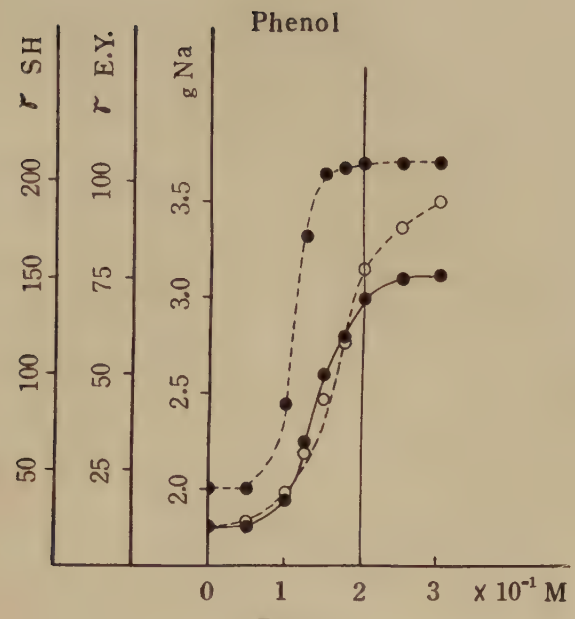

Phenol
γ SH
γ E.Y.
g Na
50
100
150
200
25
50
75
100
2.0
2.5
3.0
3.5
0
1
2
3
x 10⁻¹ M

Fig. 4

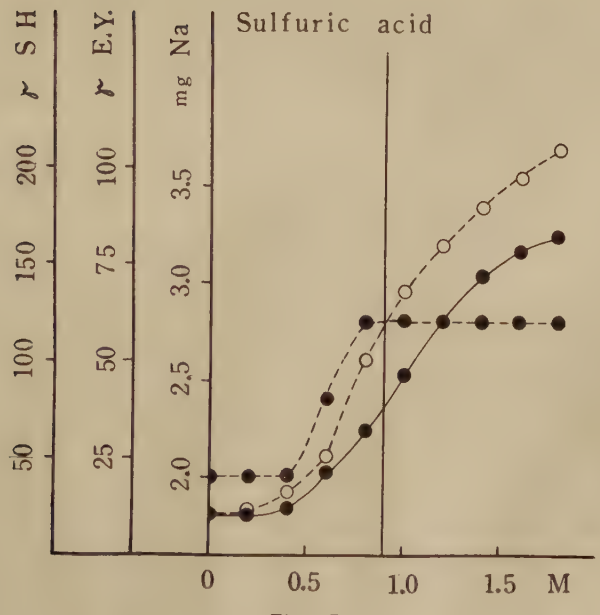

Sulfuric acid
γ SH
γ E.Y.
mg Na
50
100
150
200
25
50
75
100
2.0
2.5
3.0
3.5
0
0.5
1.0
1.5
M

Fig. 5

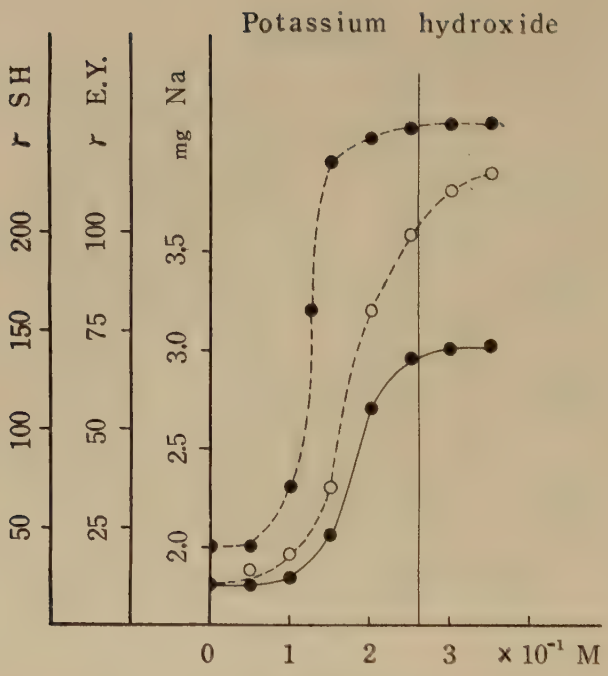

Potassium hydroxide
γ SH
γ E.Y.
mg Na
50
100
150
200
25
50
75
100
2.0
2.5
3.0
3.5
0
1
2
3
× 10⁻¹ M

Fig. 6

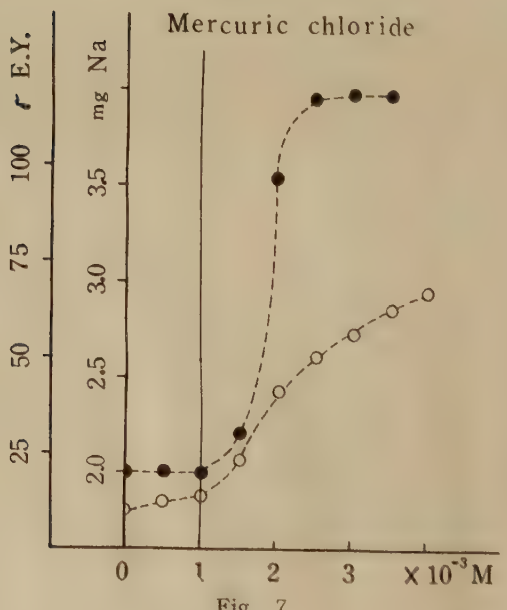

Mercuric chloride
γ E.Y.
mg Na
25
50
75
100
2.0
2.5
3.0
3.5
0
1
2
3
× 10⁻³ M

Fig. 7

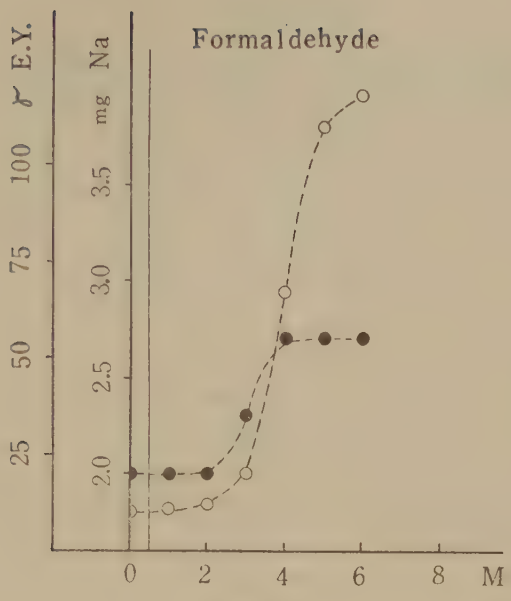


Fig. 8

in which the complete denaturation of the cell proteins arose was almost the same as the fungicidal concentration. Acetone, acid, base and phenol fell within this type. The fungicidal actions of these agents and of heating were due probably to their alterative influence exercised on the fungal cell proteins. There are some theories which contribute to the explanation of the fungicidal action of heating in the wet condition, such as protein denaturation theory, poisoning theory, asphyxiation theory, lipid liberation theory. The author's experimental results may help to give a foundation to the denaturation theory.

$HgCl_2$ and formaldehyde fell in the other type, and showed strong fungicidal action even at the concentration below that which is effective in causing the denaturation of cell proteins. It has been reported that the bacterial cells which have apparently lost their reproductive capability by Hg ion regain it when the cells have been washed with water or exposed to such sulfhydryl compounds as cysteine or glutathione.[7] It was confirmed by my experiments that, when the $HgCl_2$ treated cells were exposed to the sulfhydryl compounds, the concentration of $HgCl_2$ to show the fungicidal action was also below that which is effective in causing the denaturation of cell proteins. Therefore, it can be reasonably considered that the reaction of Hg ion to cell proteins is irreversible even at the concentration at which the denaturation of the proteins never arises.

Summary

1. The fungicidal action of 7 sorts of denaturing agents and heat treatment were studied concerning their capacity of alternating fungal cell proteins.

2. The alteration of yeast cell proteins was indicated by the change of the amount of Na ion taken in cells.

3. The comparison between the concentration to show the fungicidal action and the concentration at which the denaturation of the cell proteins arose showed that the denaturing chemicals fell in 2 types.

Acknowledgment

This investigation was completed at the Chemical Laboratory of Aquatic Products, Faculty of Agriculture, Kyushu University, under the direction of Professor Yukio Tomiyasu. The author wishes to express sincere gratitude for his kind guidance during the course of the investigation.

References

1) Hotchkiss, R. D., 1946. Ann. N. Y. Acad. Sci., **46**, 479.
2) Klotz, I. M., 1946. J. Am. Chem. Soc., **68**, 2299.
3) Klotz, I. M., Triwush, H. and Walker, F. M., 1948. J. Am. Chem. Soc., **70**, 2935.
4) Kusunoki, T., 1952. J. Biochem. (Japan), **39**, 245.
5) Haurowitz, F., 1950. "The Chemistry and Biology of Protein," p. 125, Academic Press, New York.
6) Oster, G., 1951. J. chim. phys., **48**, 217.
7) Dubos, R. J., 1949. "The Bacterial Cell," p. 287, Harvard.

水棲生物における P^{32} の吸収および代謝に関する研究—I.

マミズイトミミズによる P^{32} の吸収および代謝

小林邦男・富山哲夫

日本水産学会誌
第二十五巻 第七～九号 別冊
昭和三十四年十一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, Nos. 7–9, Nov. 1959.

水棲生物におけるP^{32}の吸収および代謝に関する研究—I.
マミズイトミミズによるP^{32}の吸収および代謝*

小林邦男・富山哲夫

(1959年6月30日受理)

STUDIES ON ABSORPTION AND METABOLISM OF P^{32} IN AQUATIC ORGANISMS—I.
TURNOVER OF P^{32} IN *RHIZODRILUS LIMASUS* (HATAI)

Kunio KOBAYASHI and Tetuo TOMIYAMA**

A number of studies were reported on the uptake of dissolved P^{32} by aquatic organisms[1]. The present authors demonstrated that the fresh water fish was able to uptake $P^{32}O_4$ ion directly from aquarium water and that the gills were the major pathway for its absorption[2]. No works have been made, however, of the turnover of the directly uptaken phosphorus among various phosphorus compounds except for that in the developing sea urchin embryo[4,5]. The present paper deals with the turnover of absorbed P^{32} in a sludge worm, *Rhizodrilus limasus* (HATAI).

The radioactivity of the worm increased rapidly and linearly with time of culture when this worm was placed in P^{32}-containing water (Fig. 1). The acid soluble fraction was prepared by blending a sharply frozen tissue with trichloracetic acid. The lipide-, nucleic acid- and phosphoprotein-form phosphorus were fractionated from the insoluble part by the SCHNEIDER method[7]. The distribution patterns of P^{32} in these four fractions were studied when the worm was active in absorbing P^{32}, on one hand, and in excreting it, on the other (Fig. 2~5). It was found that P^{32} which was absorbed by *Rhizodrilus*, entered at first into the acid soluble fraction and that the acid soluble P^{32} was largely incorporated in both nucleic acid and lipide whereas only slightly in protein (Fig. 6).

I. 緒　　言

水棲動物による水中 $P^{32}O_4$ イオンの直接吸収については，LINDBERG のウニの卵における研究をはじめ多くの研究者によつて報告されている[1]。著者等は1956年にコイが水中の $P^{32}O_4$ イオンをエラを通して直接吸収し，吸収された P^{32} は血液によつて体の各組織に運ばれ，蓄積されることを明らかにした[2]。しかし水棲動物に吸収された P^{32} の代謝については，ほとんど研究されていない。浅野等[3]はキンギョとイガイについて，水中から吸収された P^{32} の代謝について報告しているが，P^{32} の種々の燐化合物間の遷移の模様を明らかにしていない。また，VILLEE 等[4]および ALBERT 等[5]はウニの卵発生の初期における水中 $P^{32}O_4$ イオンの直接吸収およびその代謝について報告しているが，一般の水棲動物については未だ明らかにされていない。この点を究明するために本研究を行なつた。

著者等は以前水棲動物の水中 Ca イオンの吸収を吟味するに当つて，試料の取扱いが容易であり，均一に採取できるという利点から，マミズイトミミズ，*Rhizodrilus limasts* (HATAI) を用いて実験を行ない好結果を得た[6]。代謝の模様を時間的に追究する場合に，供試生物の個体差の大きいものは極力避けねばならな

---

* 本研究の大要は昭和 33 年 4 月東京における日本水産学会年会に発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem. Fac. Agr. Kyushu Univ., Fukuoka).

いので，本研究においても，まずマミズイトミミズについて実験を行なつた。この研究によつて水中から吸収された P^{32} が種々の燐化合物へ移行し，蓄積されていく模様を明らかにすることができたので報告する。

II. 実 験 方 法

P^{32} 水中で培養したマミズイトミミズは適当な時間ごとに 2g (約 140 匹) ずつとり出し，P^{32} を含まない水中でよく洗い，沪紙で水分を吸いとつた後秤量した。つぎにポリエチレンの袋に包み，ドライアイスとエタノールの混合で得た約 −40°C の冷媒に浸漬し，瞬間的に凍結させた後，約 −10°C のエタノール浴中に置いたガラス製乳鉢に入れ，トリクロル酢酸を加えて摧砕し，遠心分離によつて上澄液すなわち酸可溶性燐化合物を得た。不溶区分は SCHNEIDER 法[7] によつて燐脂質，核酸，および燐蛋白に分画した。

各試料の activity は神戸工業製 SA-5 型 G-M 計数装置によつて測定した。燐量は試料を湿式灰化法で酸化分解した後に YOUNGBURG 法[8] によつて発色させ，日立製分光光度計 EPU-2 型を用い，波長 695 mμ における吸光度から求めた。

III. 結果および考察

マミズイトミミズ 15g を P^{32} 水 (activity, 11,000 cpm./ml.; P 濃度, 70γ/l; 水温, 11～12.5°C) 3l 中に培養したところ，イトミミズの activity は Fig. 1 に示すように培養時間の経過とともに直線的に増加した。各培養時間におけるイトミミズの燐化合物を SCHNEIDER 法[7] によつて酸可溶性燐，燐脂質，核酸および燐蛋白の 4 区分に分画し，吸収された P^{32} が各燐化合物に移行していく模様を追跡した結果は Fig. 2 に示す通りであつた。酸可溶性燐の activity は最初急激に増加するが，12 時間経過した頃から次第に緩慢になつたのに対して，核酸および燐脂質の activity は培養時間の経過とともに増加し，核酸は 15 時間後，燐脂質は 19 時間後に酸可溶性燐のそれよりも大きな値に達した。燐蛋白の activity は前記の燐化合物に較べて著るしく小さな値を示した。

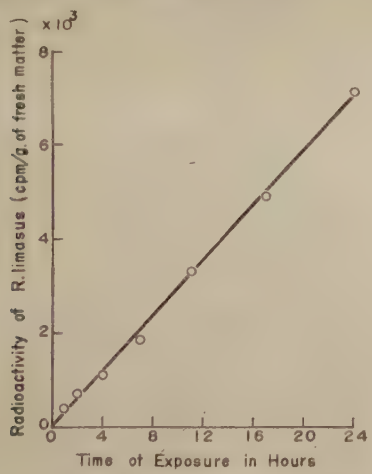


Fig. 1. Absorption of $P^{32}O_4$ ion from aquarium water by *Rhizodrilus limasus*.
Aquarium water contained radioactivity of 11,000 cpm./ml. and phosphorus of 70γ/l. Temperature ranged from 11 to 12.5°C.

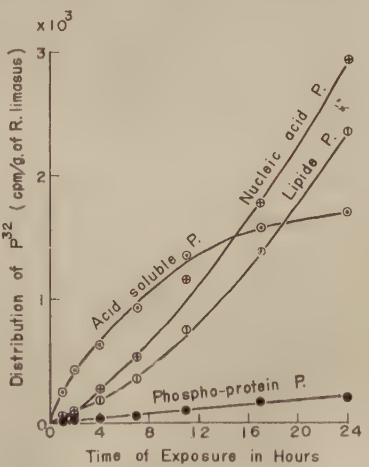


Fig. 2. Change in distribution of absorbed P^{32} in various P-compounds of *Rhizodrilus limasus*.

この各燐化合物の activity 増加の相関は Fig. 3 に示した各分画区への P^{32} の分布率によつて容易に理解できる。酸可溶性燐への activity の分布率は培養を開始してから 1 時間後では total activity の 70%

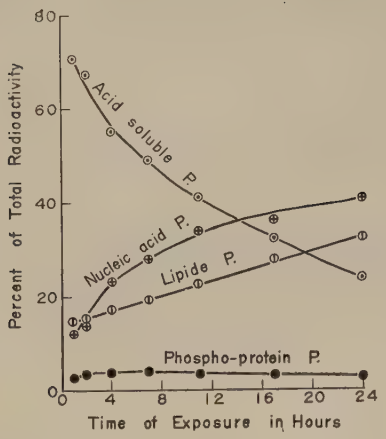


Fig. 3. Rate of incorporation of absorbed P^{32} into various P-compounds of *Rhizodrilus limasus*.

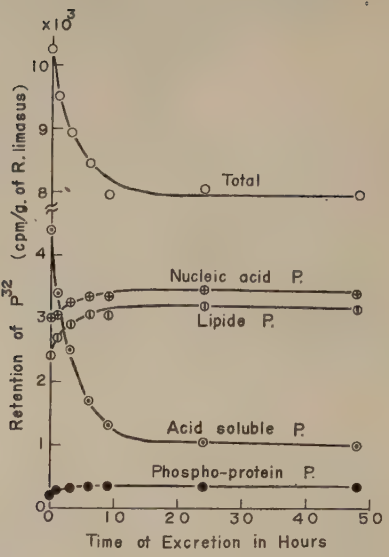


Fig. 4. Variation in retention of P^{32} in various P-fractions of *Rhizodrilus limasus* during excretion in running water.
P^{32}-water: radioactivity, 3×10^4 cpm./ml.; P, 70γ/l.; temp., 14°C.
Running water: P, 70γ/l.; temp., 13～14.5°C.

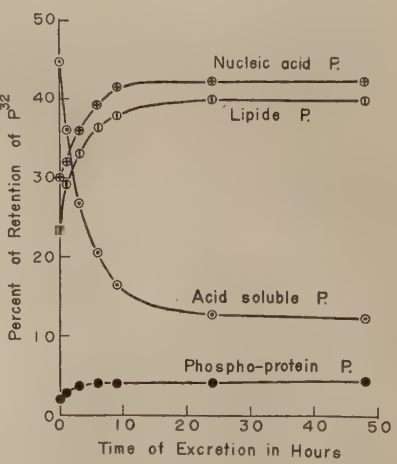


Fig. 5. Rate of retention of P^{32} in various phosphorus compounds of *Rhizodrilus limasus*.

を占めたが，12 時間後には 40% に，24 時間後には 24% に減少した。これに対して核酸および燐脂質への activity の分布率は，1 時間後では total activity の 12% および 15% であつたが，24 時間後にはそれぞれ 41% および 33% と酸可溶性燐よりもかなり大きな値を示した。燐蛋白の activity は 24 時間の培養中終始 3～4% の低い値を示したに過ぎなかつた。以上の結果から吸収された P^{32} はまず酸可溶性燐化合物中に入り，漸次核酸および燐脂質に移行蓄積されると看做してよいが，この模様を更に明らかにするためにつぎのような実験を行なつた。

イトミミズ 15g を activity の高い P^{32} 水 (activity, 3×10^4 cpm./ml.; P 濃度, 70γ/l.; 水温, 14°C) 3l 中に 4 時間培養した後，P^{32} を含まない流水 (P 濃度, 70γ/l.; 水温, 13～14.5°C) 中に移して 48 時間培養し，その期間におけるイトミミズに吸収された P^{32} の各燐化合物間の遷移の模様を追跡した。イトミミズの total activity および各燐化合物の activity の変動は Fig. 4 に示す通りであつた。イトミミズの total activity はイトミミズを P^{32} 水中から流水中に移した直後は，生鮮物 1g 当り 10,200 cpm. であつたが，10 時間後には約 8,000 cpm. に減少した。しかし，それ以後 2 日間の培養中 activity の減少はほとんど認められなかつた。各燐化合物の activity は流水中における培養時間の経過とともに著るしく変動した。すなわち，イトミミズの生鮮物 1g 中の酸可溶性燐の activity は 24 時間の間に 4,400 cpm. から 1,000 cpm. へと著るしく減少したが，他方核酸および燐脂質の activity は，外部からの P^{32} の供給が断たれ，その上に total activity が 20% も減少したにも拘わらず，それぞれ 3,000 cpm. から 3,400 cpm. および 2,400 cpm. から 3,000

cpm. に増加し，燐蛋白の activity も僅かながら増加した。

各燐化合物の activity の変動の模様は activity の分布率を求めることによって一層明瞭である。Fig. 5 にその分布率を示した。酸可溶性燐の activity が最初 total activity の 45% を占めたにも拘わらず，9 時間後には 16% に，24 時間後には 13% に減少したのに対して，核酸および燐脂質では最初 30% および 23% であつたのが 9 時間後には 42% および 38% に，24 時間後には 43% および 39% に増し，以後平衡状態を示した。燐蛋白の activity も最初 2% であつたのが 9 時間後には 4% に，24 時間後には 4.5% に増加した。

Table 1. Amounts of P in various phosphorus compounds of *Rhizodrilus limasus* at 24-hour culture.
Water contained phosphorus of 70γ/l. Temperature ranged from 11 to 12.5°C.

	Amounts of P (γ/g. of *R. limasus*)	Distribution of P (%)
Acid soluble P	695	41
Lipide P	510	30
Nucleic acid P	378	22
Phospho-protein P	130	7
Total	1,713	100

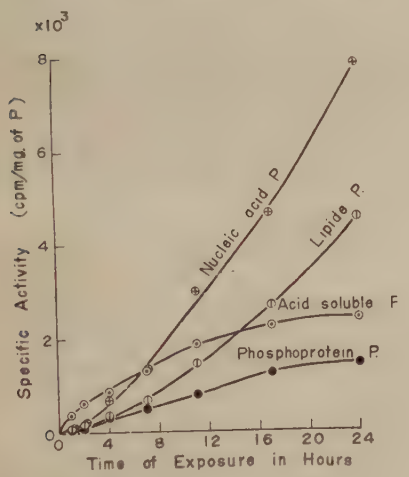


Fig. 6. Change in specific activity in various P-compounds of *Rhizodrilus limasus*.
Aquarium water contained radio-activity of 11,000 cpm./ml. and phosphorus of 70γ/l. Temperature ranged from 11 to 12.5°C.

なお，酸可溶性燐化合物の activity の減少量は Fig. 4 の結果から分るように，total activity の減少量と核酸，燐脂質および燐蛋白の activity の増加量との和に等しく，水中からイトミミズに吸収された P^{32} はまず酸可溶性燐化合物中に入り漸次核酸，燐脂質に移行し，蓄積されていくことが明らかになつた。

つぎにイトミミズの P^{32} 吸収の実験 (Fig. 1～3) において 24 時間培養した試料から各燐化合物を分画し，これらを常法によつて湿式灰化した後に YOUNGBURG 法[8] によつて燐量を定量した。その結果は Table 1 に示すようであつた。イトミミズの各燐化合物の燐量は 24 時間の培養中に変化しなかつたものと看做して，各培養時間における各燐化合物の specific activity (cpm./mg. of P) を求めた結果は Fig. 6 のようであつた。Fig. 6 から明らかなように，最初酸可溶性燐の specific activity は各分画区中最も大きな値を示したが，12 時間経過した頃からその増加は次第に緩慢になり，17 時間を過ぎる頃から漸次平衡状態に近づく傾向が認められる。これに対して，核酸の specific activity は培養時間の経過とともに増加し，7 時間後には酸可溶性燐と同じ値を示し，以後急速に増加し，16 時間後には酸可溶性燐の 2 倍，23 時間後には 3 倍に達した。また燐脂質の specific activity も培養時間の経過とともに増加し，15 時間後には酸可溶性燐と同じ値を示し，24 時間後には約 2 倍に達した。燐蛋白の specific activity も培養時間の経過とともに次第に増加したが，常に各分画中の最小値を示した。これらの事実は，核酸および燐脂質に移行した燐が漸次蓄積されるのに対して，酸可溶性燐化合物においては燐の turnover が極めて活潑に行なわれていることを示している。

IV. 総　　括

水棲生物における P^{32} の吸収および代謝について研究するに当り，まず取扱いが容易であり，均一な試料

がとれるマミズイトミミズ，*Rhizodrilus limasus* (HATAI)，を用いて実験を行なつた。

1. P^{32} 水中に培養したイトミミズの activity は培養時間の経過とともに直線的に増加した。

2. 水中からイトミミズに吸収された P^{32} は，最初酸可溶性燐化合物中に入り，漸次核酸および燐脂質に移行，蓄積される。

3. 酸可溶性燐化合物中の燐の turnover は核酸および燐脂質に較べて活潑である。

本研究には文部省科学研究費（綜合研究）の援助を得た。ここに謝意を表す。

文　　献

1) OLOV LINDBERG: *Arkiv. Kemi., Mineral Geol.* **26** B, No. **13**, 4 (1948). R. R. RONKIN: *J. Cellular Comp. Physiol.* **35**, 241～60 (1950). ——: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **73**, 41～4 (1950). LORIN J. MULLINS: *Acta. Physiol. Scand.* **21**, 303～14 (1950). GERRIT BEVELANDER: *New York J. Dentistry* **21**, 305～8 (1951). ——: *Biol. Bull.* **102**, 9～15 (1952). A. M. PHILLIPS, D. R. BROCKWAY, F. E. LOVELACE and G. C. BALZER: *Cortland hatchery report* **22**, New York Conser. Dept., Albany, N. Y. (1953). SUMNER C. BROOKS and EDWARD L. CHAMBERS: *Biol. Bull.* **106**, 279～96 (1954). EDWARD L. CHAMBERS and WILLIAM E. WHITE: *Biol. Bull.* **106**, 297～307 (1954). 辻井禎・吉井義一・岡田彌一郎・井上義雄・宮村光武: 本誌, **20**, 107～11 (1954). I. A. SHEKHANOVA: *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **106**, 161～4 (1956). J. FRAGA DE AZEVEDO, F. A. CARVAÕ GOMES, ANTÓNIO M. BAPTISTA, E. MENDES MAGALHÃES, and F. BRAGANCA GIL: *Garcia Orta* **4**, 523～9 (1956). V. S. KIRPICHNIKOV, A. N. SVETOVIDO, and A. S. TORSHIN: *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.* **111**, 221～4 (1956). 吉井義一・渡部哲光・岡田彌一郎: 本誌, **22**, 240～3 (1956). EUGENE HARRIS: *Can. J. Zool.* **35**, 769～82 (1957). M. P. BOGOYAVLENSKAYA and I. A. SHEKHANOVA: *Izuchenie Zhivotn. Organizma.* (Moscow: Akad. Nauk S. S. S. R.) *Sbornik* 1958, 207～11. ——: *Referat. Zhur. Khim., Biol. Khim.* 1958, Abstr. No. **24935**.

2) T. TOMIYAMA, K. KOBAYASHI and S. ISHIO: *"Research in the Effects and Influences of the Nuclear Bomb Test Explosions"* (Japan Society for the Promotion of Science) p. 1195～1200 (1956).

3) MOTOKAZU ASANO and MASAO ITO: *Tohoku J. Agr. Research* **7**, 291～302 (1957).

4) C. A. VILLEE, M. LOWENS, M. GORDON, E. LEONARD, and A. RICH: *J. Cellular Comp. Physiol.* **33**, 93～112 (1949).

5) ALBERT L. BOLST and ARTHUR H. WHITELEY: *Biol. Bull.* **112**, 276～87 (1957).

6) T. TOMIYAMA, K. KOBAYASHI and S. ISHIO: *"Research in the Effects and Influences of the Nuclear Bomb Test Explosions"* (Japan Society for the Promotion of Science) p. 1173～1176 (1956).

7) W. C. SCHNEIDER: *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945).

8) YOUNGBURG, G. E. and YOUNGBURG, M. V.: *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 158 (1930).